

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ NIKOTINU V RŮZNÝCH TYPECH VÝROBKŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

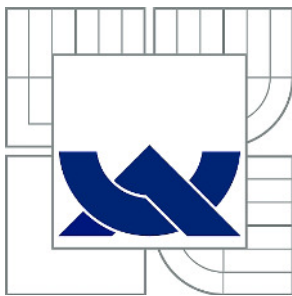
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA PRAŽÁKOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ NIKOTINU V RŮZNÝCH TYPECH VÝROBKŮ

ANALYSIS OF NICOTIN CONTENT IN SOME PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JANA PRAŽÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0910/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jana Pražáková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Petra Matoušková	

Název diplomové práce:

Stanovení nikotinu v různých typech výrobků

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše zaměřená na přehled přípravků obsahujících nikotin a metody jeho analýzy.
2. Zavedení a optimalizace metody izolace a analýzy nikotinu v různých typech matric.
3. Experimentální studie - srovnání obsahu nikotinu v různých druzích potravinářských a tabákových výrobků.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Pražáková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením nikotinu v různých typech výrobků. V teoretické části je shrnuto pojednání o nikotinu, o kouření a možnostech odvykání. V praktické části byla optimalizována metoda stanovení nikotinu metodou HPLC/PDA. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla zvolena kolona Kinetex 5u C18 100A 150 x 4,6 mm, optimální mobilní fází byl zvolen čistý methanol, při průtoku $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teplotě 25°C . Pro analýzu nikotinu bylo vybráno 18 druhů náplní do elektronických cigaret, dva druhy nikotinových žvýkaček, jeden nikotinový sprej, jedny nikotinové pastilky, orodispergovatelný nikotinový film a deset druhů klasických cigaret. Pro každý druh výrobku byl hledán nejvhodnější způsob extrakce nikotinu a jeho následná analýza metodou HPLC/PDA. Pro tabákové výrobky byla zvolena 24 hodinová extrakce v methanolu a působení ultrazvuku po dobu 10 sekund. Nikotinový sprej, a náplně do elektronických cigaret bez příchutí, byly pouze methanolem zředěny. Náplně s příchutěmi byly nejdříve zředěny hydroxidem sodným a poté methanolem. Pro žvýkačky, pastilky a nikotinový film byla jako nejvhodnější ověřena extrakce 5% hydroxidem sodným. V práci byl navržen vlastní nikotinový produkt. Nikotin byl enkapsulován do alginát-škrobového materiálu za vzniku malých gelových částic. Jako nejvhodnější prostředí pro jejich skladování bylo navrženo vodné prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

nikotin, optimalizace, HPLC/PDA, enkapsulace

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the determination of nicotine in different products. The theoretical part summarizes review on nicotine, smoking and opportunities how to quit. In the practical part a method for the determination of nicotine by HPLC / PDA was optimized. As the most suitable stationary phase was selected a Kinetex 5u C18 100A 150 x 4.6 mm column, as the optimal mobile phase was chosen a pure methanol with a flow rate of $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ and a temperature of $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. For the analysis of nicotine were chosen: 18 kinds of cartridges for electronic cigarettes, two kinds of nicotine gum, nicotine spray, nicotine pastilles, nicotine orodispersible film and ten species of classic cigarettes. For each type of product the most appropriate method for extracting nicotine and its subsequent analysis by HPLC / PDA was found. For tobacco 24 hour extraction in methanol and 10s ultrasound was selected. The nicotine spray and electronic cigarette refills without flavours were only diluted with methanol. Flavoured refills were first diluted by sodium hydroxide and then with methanol. For chewing gums, pastilles and nicotine film extraction with 5% sodium hydroxide was chosen. In this study also new experimental nicotine product was designed. Nicotine has been encapsulated in alginate-starch material to form small gel particles. As the most suitable medium for storage the water medium was determined.

KEY WORDS

nicotine, optimalization, HPLC/PDA, encapsulation

PRAŽÁKOVÁ, J. *Stanovení nikotinu v různých typech výrobků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 77 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady a všestrannou pomoc. Dále děkuji Ing. Petře Matouškové za trpělivost a veškerou pomoc, nejen při měření experimentální části.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	<i>Tabák.....</i>	<i>10</i>
2.2	<i>Nikotin</i>	<i>10</i>
2.2.1	Nikotin v těle	11
2.2.2	Působení nikotinu.....	12
2.2.3	Zdravotní zhodnocení nikotinu a kouření	12
2.2.4	Závislost na nikotinu.....	12
2.2.5	Toxicita nikotinu.....	13
2.2.6	Pozitivní účinky nikotinu	13
2.3	<i>Tabákové výrobky v legislativě</i>	<i>14</i>
2.4	<i>Tabákový kouř a jeho složení.....</i>	<i>15</i>
2.4.1	Pyridinové alkaloidy	15
2.4.2	Plynné složky	15
2.4.3	Nitrosaminy.....	16
2.4.4	Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	16
2.4.5	Těžké kovy	16
2.4.6	Dehet.....	16
2.5	<i>Pasivní kouření.....</i>	<i>17</i>
2.6	<i>Odvykání kouření.....</i>	<i>18</i>
2.7	<i>Náhradní nikotinová terapie.....</i>	<i>18</i>
2.7.1	Nikotinové náplasti	18
2.7.2	Nikotinové žvýkačky	19
2.7.3	Nikotinové pastilky a mikrotablety	20
2.7.4	Orodispergovatelný film.....	20
2.7.5	Nikotinové spreje	21
2.7.6	Elektronické cigarety	21
2.7.6.1	Složení tekuté náplně do elektronické cigarety	22
2.7.6.2	Princip fungování elektronické cigarety	22
2.8	<i>Beznikotinová terapie.....</i>	<i>23</i>
2.9	<i>Metody stanovení nikotinu.....</i>	<i>24</i>
2.9.1	Kapalinová chromatografie	24
2.9.1.1	HPLC s fluorescenční detekcí	25
2.9.1.2	HPLC s UV-VIS detekcí	25
2.9.1.3	HPLC s hmotnostní detekcí.....	25
2.9.2	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	26
2.10	<i>Enkapsulace</i>	<i>26</i>
2.10.1	Princip enkapsulátoru	26
3	CÍLE PRÁCE.....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1	<i>Použité přístroje, chemikálie a materiál</i>	<i>29</i>

4.1.1	Přístroje	29
4.1.2	Použité chemikálie	29
4.1.3	Materiál pro analýzu	30
4.1.3.1	Náplně do elektronických cigaret	30
4.1.3.2	Nikotinové žvýkačky	31
4.1.3.3	Orodispergovatelný film	31
4.1.3.4	Nikotinové pastilky	32
4.1.3.5	Nikotinový sprej	32
4.1.3.6	Šňupací tabák	33
4.1.3.7	Klasické cigarety	33
4.2	<i>Optimalizace stanovení nikotinu metodou HPLC/PDA</i>	35
4.2.1	Optimalizace vhodné stacionární fáze	35
4.2.2	Optimalizace složení mobilní fáze	35
4.2.3	Optimalizace průtoku mobilní fáze a použité teploty při analýze	35
4.3	<i>Optimalizace extrakce nikotinu</i>	36
4.3.1	Příprava vzorku pro extrakci v methanolu	36
4.3.2	Příprava vzorku pro zásaditou hydrolýzu hydroxidem sodným	36
4.3.3	Příprava vzorku pro kyselou hydrolýzu kyselinou chlorovodíkovou	36
4.3.4	Příprava vzorku pro kyselou hydrolýzu kyselinou sírovou	36
4.4	<i>Návrh vlastního produktu s nikotinem</i>	37
4.4.1	Příprava chitosanových částic	37
4.4.2	Příprava alginátových částic	37
4.4.3	Příprava alginát-škrobových částic	37
4.4.4	Příprava alginátových částic pomocí enkapsulátoru	37
4.4.5	Stanovení enkapsulační účinnosti	38
4.4.6	Stabilita částic v trávicích šťávách	38
4.4.6.1	Složení modelové žaludeční šťávy	38
4.4.6.2	Složení modelové pankreatické šťávy	38
4.4.6.3	Složení modelové žlučové šťávy	38
4.4.7	Stabilita částic v některých z modelových prostředí	38
4.5	<i>Spotřebitelský dotazník</i>	39
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	<i>Optimalizace stanovení nikotinu metodou HPLC</i>	40
5.1.1	Výběr vhodné stacionární fáze	40
5.1.2	Výběr vhodné mobilní fáze	41
5.2	<i>Optimalizace extrakce nikotinu z tabákového materiálu</i>	42
5.3	<i>Optimalizace extrakce nikotinu v různých druzích výrobků a jeho stanovení</i>	44
5.3.1	Stanovení nikotinu v náplních do elektronických cigaret	44
5.3.2	Stanovení nikotinu v nikotinových pastilkách	45
5.3.3	Stanovení nikotinu v orodispergovatelném filmu	45
5.3.4	Stanovení nikotinu v nikotinových žvýkačkách	46
5.3.5	Stanovení nikotinu v nikotinovém spreji	47
5.3.6	Stanovení nikotinu ve šňupacím tabáku	47

5.3.7	Stanovení nikotinu v klasických cigaretách	47
5.4	<i>Návrh vlastního produktu s nikotinem</i>	48
5.4.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	48
5.4.2	Stabilita v trávících šťávách	49
5.4.3	Stabilita částic v některých z modelových prostředí potravin.....	51
5.4.4	Zhodnocení vlastního produktu	51
5.5	<i>Spotřebitelský dotazník</i>	53
5.5.1	Odpovědi kuřáků	53
5.5.2	Odpovědi bývalých kuřáků	57
5.5.3	Odpovědi nekuřáků	61
5.5.4	Zhodnocení průzkumu	63
6	ZÁVĚR	64
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	66
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	72
9	SEZNAM PŘÍLOH	73
10	PŘÍLOHY	74

1 ÚVOD

Tabákové výrobky jsou vyrobené ze sušených tabákových listů a jsou určeny především ke kouření, nebo žvýkání či šňupání. Všechny tyto výrobky obsahují vysoce návykovou látku zvanou nikotin. Závislost na nikotinu je dnes nejvíce rozšířená závislost. Podle 10. verze Mezinárodní klasifikace nemocí světové zdravotní organizace, je závislost na tabáku samostatnou nemocí [1,2].

Na světě je čím dál více lidí, kteří si uvědomují následky kouření a tak hledají způsoby, jak s ním přestat. Díky nikotinu, na kterém si člověk vytvoří velice snadno závislost, je odvykání kouření poněkud namáhavé. K ulehčení by měly sloužit výrobky obsahující nikotin, které při užívání pomáhají s abstinenčními příznaky. Další možnost je volba kouření elektronických cigaret, při kterém nevznikají tisíce zdraví škodlivých chemických látek. Ovšem i při kouření elektronických cigaret vzniká dým, ve kterém je přítomna celá řada škodlivých látek, v porovnání s klasickými cigaretami jsou ale na mnohem nižší úrovni [3].

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací stanovení nikotinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Kapalinová chromatografie je dnes velmi oblíbená a používaná analytická metoda. Dále byl v rámci práce navržen vlastní nikotinový produkt jako další možná náhrada nikotinu. Posledním bodem této práce je spotřebitelský dotazník, zaměřený na informovanost lidí o alternativních možnostech příjmu nikotinu, o závislosti na kouření, či povědomí o účincích nikotinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tabák

Jako tabák se dnes označuje produkt z listů rostliny, který se díky obsahu nikotinu užívá ve formě cigaret, doutníků nebo například vodních dýmek. Tabák myšlený jako rostlina je rod *Nicotiana* z čeledi lilkovitých, do které se zařazují i brambory, lilek nebo rajčata.

Dnes se tabák pěstuje po celém světě, mezi největší producenty patří Čína, Brazílie a Indie. Existuje 64 druhů rodu *Nicotiana*, pro tabákový průmysl se však využívají jen dva základní. Jedná se o *Nicotiana tabacum* – tabák virginský a *Nicotiana rustica* – tabák selský [4].

Tabák původem pochází z Ameriky, kde byl objeven a pěstován dříve jak před 6 000 lety př. n. l. Od té doby lidé žvýkají listy nebo ho užívají ve formě kouření cigaret. Už tenkrát věřili, že má tabák léčivé účinky, byl používán například k ochraně proti řádění dýmějového moru ve středověku. Dnes se často přiřazují negativnější účinky, hlavně se spojením onemocněním dýchacích cest od kouření, například rakovina, respirační onemocnění a jiné poruchy [5].

Rostlina tabáku obsahuje asi 5 % hmotnostních alkaloidu nikotinu, který se přirozeně vyskytuje jako kapalina [5].

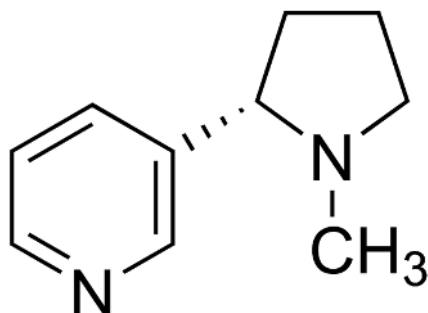


Obrázek č. 1: *Nicotiana tabacum* [6]

2.2 Nikotin

Z chemického hlediska patří nikotin mezi aminy, které lze považovat za organické deriváty amoniaku, a často se vyskytují v přírodních materiálech, jak v rostlinných, tak i v živočišných. Nikotin obsahuje atom dusíku s volným elektronovým párem, který látce uděluje bazické a nukleofilní vlastnosti [7].

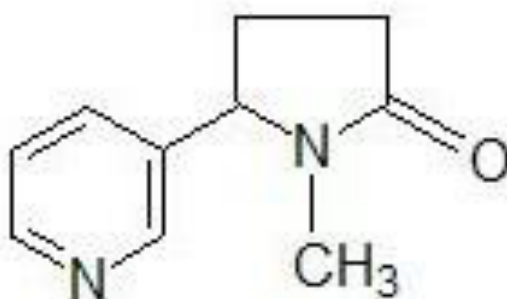
Strukturní vzorec je (S)-3-(1-methyl-2-pyrrolidiny)pyridin, sumární vzorec pak $C_{10}H_{14}N_2$. Na obrázku č. 2 je pak znázorněna jeho struktura.



Obrázek č. 2: Nikotin [8]

2.2.1 Nikotin v těle

Při kouření cigarety se nikotin začne vstřebávat již deset sekund po vdechnutí. Vstřebává se jak kůží, sliznicí v nosu, ústech a plicích a poté putuje krevním řečištěm až do mozku. To vede k stimulaci nadledvinek a tvorbě adrenalinu, což pak způsobí zvýšení srdečního tepu a krevního tlaku. Dalším účinkem je náhlé uvolnění glukózy a zároveň potlačení přístupu inzulínu, což způsobuje mírnou hyperglykémii. Nejúčinnější příjem nikotinu do krevního oběhu je právě vdechováním, protože plicní sklípky poskytují více povrchu pro vstřebání. V každé plíci se jejich plocha odhaduje na 140 m^2 . Další způsob vstřebávání nikotinu může být absorbováním prostřednictvím zažívacího traktu a kůží, a to z takzvaných bezdýmových tabákových výrobků jako jsou nikotinové žvýkačky, různé pastilky, šňupací tabák nebo nikotinové náplasti. Po vstřebání se většina nikotinu, až 80 %, v játrech enzymy rozloží na primární metabolit kotinin. Nikotin má v těle poločas rozpadu zhruba hodinu až dvě, kdežto kotinin 16 hodin. Kotinin může být měřen v séru, moči, slinách nebo vlasech a je považován za nejlepší biomarker expozice tabákového kouře. Akutní intoxikace nikotinem může způsobovat zvracení, závratě, pocení, zvýšené slinění, nevolnost, průjemy, změny krevního tlaku a tepové frekvence, křeče až smrt [5,9].



Obrázek č. 3: Kotinin [10]

2.2.2 Působení nikotinu

Nikotin na člověka může působit pozitivně, vyvolává pocity uvolnění, je schopen snižovat stres, úzkost a někdy i bolest. Proto se kuřáci často obrací po cigaretě právě ve stresové situaci nebo ve špatné náladě. V závislosti na dávce nikotinu vznikají v centrálním nervovém systému příslušné požítky. Některé studie ale naznačují, že za uklidňujícími účinky kouření může být rituál samotného kouření cigarety, od vložení do úst, zapálení až vlastní potáhnutí.

Při prvním nádechu nikotinu začne tělo uvolňovat hormon adrenalin, který aktivuje nervový systém, zrychlí se dýchání, srdeční tep i krevní tlak a zbystří se pozornost [5].

Nikotin je hlavní látka, která stimuluje cholinergní receptory v gangliích. Podle ní se jim také říká nikotinové receptory. Další účinek je dráždění, může způsobit až svalové záškuby, resp. křeče. Tyto účinky se dostávají často po jiných než inhalačních formách nikotinu [11].

Nikotin také zvyšuje obsah ostatních neurotransmiterů a chemických látek, které ovlivňují fungování mozku. Při zvýšené hladině nikotinu se tvoří více endorfinů. To jsou malé proteiny, které bývají často označovány jako přirozený lék proti bolesti. Vyvolávají pocity euforie, což může vysvětlovat uspokojující účinky kuřáků při příjmu nikotinu [5].

2.2.3 Zdravotní zhodnocení nikotinu a kouření

Užívání tabáku ve všech formách doprovází mnoho zdravotních problémů. Uvádí se, že ročně umírá 440 000 kuřáků na onemocnění způsobené právě kouřením. Tabákový kouř obsahuje nejméně 250 chemických látek, o kterých je známo, že mají toxické účinky nebo mohou přispívat ke vzniku rakoviny. Riziko vzniku některých onemocnění, jako jsou kardiovaskulární problémy, se tvoří již při zvyku vykouření jedné až pěti cigaret denně. Další známé rizika užívání nikotinu mohou být zápal plic, rozedma plic, infekce dýchacích cest, šedý zákal a jiné oční problémy, časté druhy rakoviny jako rakovina úst, hltanu, hrtanu, jícnu, žaludku, slinivky břišní, děložního čípku, ledvin, močovodu, močového měchýře stejně jako některé druhy leukémie. Až devět z deseti lidí s diagnózou rakoviny plic si k této diagnóze pomohlo svými kuřáckými návyky. U kuřáků je také větší pravděpodobnost, že trpí diabetem, paradentózou, neplodností či vyššími komplikacemi v těhotenství a často podléhají dřívějším fyzickým změnám než nekuřáci, jako je například předčasné stárnutí kůže, žluté skvrny na kůži a zubech. V průměru se uvádí, že nekuřáci žijí i o deset let více než kuřáci [5].

I přes všechny negativní stránky účinků nikotinu a kouření se dnes mluví i o pozitivních účincích. Už domorodí Američané nejen z rituálních důvodů tabák udili, ale byli také přesvědčení o jeho léčivých vlastnostech. A to se potvrzuje v některých výzkumech i dnes. Při bezpečnějším příjmu nikotinu do těla, než je ze zapálené cigarety, kdy se do organismu vstřebávají stovky dalších nebezpečných látek, se dnes ukazují jeho účinky, například o snížení rizika vzniku Parkinsonovy choroby. Další možné použití je možné hledat při léčbě deprese, úzkosti nebo schizofrenie, a v některých situacích třeba i při pomoci s hojením ran [5].

2.2.4 Závislost na nikotinu

Nikotin je stejně návyková látka jako například kokain nebo heroin a je velmi obtížné ji pro závislé lidi přestat užívat. K vytvoření závislosti stačí již opakovaně nepatrné množství nikotinu, které se dostane do organismu z jedné cigarety, což je zhruba 1 mg. Opakovaný

příjem nikotinu způsobuje, že jsou časem potřeba vyšší dávky pro uspokojení, než na začátku jeho užívání. S kouřením chce přestat velká část kuřáků, ale uvádí se, že přes více než 85 % z nich se po snaze přestat bez odborného dohledu k cigaretě vrátí do jednoho týdne. Závislost ovšem nevzniká pouze z kouření cigaret, ale může vzniknout i z užívání bezdýmových tabákových výrobků. Kromě psychických problémů při odvykání kouření jako jsou stavy úzkosti, hněvu, frustrace, deprese, podrážděnost či neklid, mohou přijít i reakce fyzické, jako zvýšená chuť k jídlu, nespavost, poruchy spánku [12,13].

Pro zjištění míry nikotinové závislosti se používá velmi rychlý a jednoduchý test. Ten je po celém světě známý pod názvem Fagerströmův test nikotinové závislosti. Každá otázka je ohodnocena určitým počtem bodů a sečtením všech bodů se vyhodnotí, zdali je závislost žádná nebo velmi malá, střední či vysoká [14]. Znění testu i jeho vyhodnocení je uvedeno v příloze č. 1.

2.2.5 Toxicita nikotinu

Jednorázový vyšší příjem nikotinu může být fatální. Perorální dávka nikotinu, která pro člověka může být smrtelná, je 50 - 60 mg. Pro představu, perorální dávka 50 - 60 mg u zhruba 70-kilového člověka je srovnatelná s působením asi 30 - 40 mg·m⁻³ po dobu 30 minut, za předpokladu frekvence dýchání 50 litrů za minutu se 100% účinností vstřebání [15].

Například při užívání nikotinových žvýkaček nebo jiných nikotinových produktů, by člověk neměl překročit jejich určité množství za den, protože by mohlo hrozit předávkování nikotinem.

Nejčastějším příznakem otravy je zvracení. Příznaky se objevují do patnácti minut od požití. Mezi další příznaky patří záchvaty, svalové záškuby, poruchy srdečního rytmu, pomalý tep a kolísající krevní tlak. Ve vysokých koncentracích může způsobit smrt zhruba do jedné hodiny od požití, obvykle v důsledku ochrnutí svalů, což vede k selhání srdce, či nahromadění tekutiny v dýchacích cestách a plicích [5].

Byly potvrzeny i případy, kdy byl nikotin využit na způsob sebevraždy. Jistá žena si na tělo nalepila velké množství nikotinových náplastí, což v konečném důsledku vedlo k předávkování a smrti. Jiný muž si vyrobil vlastní náplasti nasáklé extraktem z jemně mletého tabáku [16].

2.2.6 Pozitivní účinky nikotinu

Kromě všech negativních účinků nikotinu a kouření vědci zjišťují i jeho světlou stránku. Jsou prokázány některé prospěšné účinky nikotinu, které byly poprvé pozorovány právě u kuřáků. Je prokazatelné, že kouření dělá v organismu mnohem více škod než užitku a důrazně se nedoporučuje, ale pro zlepšení některých stavů nemocí může být prospěšné. Například při poruchách pozornosti, zánětlivého onemocnění střev, neurologického onemocnění zvaného Tourettův syndrom nebo Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Nikotin je mezi lidmi stále označován jako špatný, protože je vázán s představou cigarety a kouření.

I údaje, které berou v úvahu předčasnou smrt některých kuřáků, naznačují, že kuřáci mají poloviční riziko vzniku Parkinsonovy choroby, než ti, kteří nikdy nekouřili. Několik studií ukazuje i snížení rizika Alzheimerovy choroby, zvláště u dědičných forem onemocnění. Další studie ukázaly, že nikotin může zlepšovat paměť a učení, jelikož zvyšuje prokrvení

mozku [17]. Jiné pozorování potvrdilo, že ulcerózní kolitidou, což je chronický zánět tlustého střeva a konečníku, onemocní většinou nekuřáci. V jedné kontrolované studii vědci z Univerzity Hospital of Wales v Cardiffu zjistili, že po šesti týdnech užívání nikotinových náplastí se pacientům výrazně zlepšily příznaky. Na velmi příbuzné onemocnění střev, Crohnovu chorobu, však kouření působí zcela naopak, zvyšuje jeho riziko i zhoršuje průběh onemocnění [18]. U schizofrenních pacientů, kteří na své onemocnění dostávají léky s vedlejšími příznaky jako je zhoršení bdělosti a paměti, podání nikotinu tyto příznaky výrazně snížilo [17].

2.3 Tabákové výrobky v legislativě

Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů (předpis č. 110/1997 Sb) § 12 říká, že k výrobě tabákových výrobků lze použít pouze surový nebo technologicky upravený tabák a povolené látky v přípustném množství stanoveném vyhláškou [19].

Vyhláška, kterou se stanoví požadavky na tabákové výrobky (předpis č. 344/2003 Sb.) pojednává o druzích tabákových výrobků a jejich členění (viz tabulka č. 1), označování obalů tabákových výrobků, povinném varování na obalech výrobků určených ke kouření, požadavky na jakost tabákových výrobků a jiné. Obsah dehtu v cigaretách uváděných do oběhu nesmí být vyšší než 10 mg na cigaretu, obsah nikotinu nesmí být vyšší než 1 mg na cigaretu a obsah oxidu uhelnatého nesmí být vyšší než 10 mg na cigaretu. U výrobků určených ke kouření musí být na obalech uvedeno jedno obecné a jedno dodatečné varování. Obecné varování jsou: "Kouření může zabíjet", nebo "Kouření vážně škodí Vám i lidem ve Vašem okolí". Dodatečné varování jsou například: "Kouření ucpává tepny a způsobuje infarkt a mrtvici", "Kouření způsobuje smrtelnou rakovinu plic", "Kouření v těhotenství škodí zdraví Vašeho dítěte" nebo "Chraňte děti: nenuťte je vdechovat Váš kouř" [20].

Tabulka č. 1: Druhy tabákových výrobků a jejich členění [20]

Druh	Skupina	Podskupina
cigarety		
doutníky a cigarillos		
tabák	tabák ke kouření	cigaretový k ruční výrobě cigaret dýmkový a lulkový tabákový odpad
	tabák šňupací tabák žvýkací tabák orální tabák ostatní	

Zákon o opatřeních k ochraně před škodami působenými tabákovými výrobky, alkoholem a jinými návykovými látkami a o změně souvisejících zákonů (předpis č. 379/2005 Sb.) určuje zákazy a omezení prodeje tabákových výrobků a povinnosti osob prodávajících tabákové výrobky, zakazuje kouření na veřejných místech, které jsou přesně specifikované.

Prodej tabákových výrobků, tabákových potřeb a elektronických cigaret je zakázán osobám mladším 18 let [21].

2.4 Tabákový kouř a jeho složení

Tabákový kouř nevzniká spalováním pouze tabáku, ale také stovky látek, které se do cigaret záměrně přidávají. Na celém světě se jich používá asi 700. Přidávají se z nejrůznějších důvodů, nejen ke zlepšení senzorických vlastností, ale například aby cigareta hořela stejnoměrně a neuhasínala, aby váleček popele upadnul z cigarety až po oklepnutí, či aby se kouř z cigarety hezky vinul [22].



Obrázek č. 4: Schéma nebezpečných látek v cigaretě [19]

2.4.1 Pyridinové alkaloidy

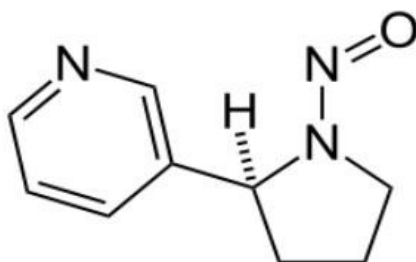
Kromě nejvýznamnějšího alkaloidu nikotinu, který je popsán vyčerpávajícím způsobem výše, jsou v tabákovém kouři obsaženy další alkaloidy, anatabin a anabasin. Oba jsou vylučovány močí a mohou sloužit jako biomarkery expozice tabákového kouře. Dalším alkaloidem je také anatalin [22].

2.4.2 Plynné složky

Z toxikologického hlediska je nejvýznamnější zplodina spalování tabáku oxid uhelnatý. Tento jedovatý plyn, který je bez chuti a bez zápachu, má vysokou afinitu k hemoglobinu, až 220krát vyšší než má kyslík. Proto je ovlivněn přenos kyslíku do tkání a dochází k vnitřnímu udušení. Další plyny obsažené v tabákovém kouři jsou oxidy dusíku, pro organismus je nebezpečný hlavně oxid dusičitý. Ten způsobuje velké dráždění sliznice. Za další je v tabákovém kouři obsažen formaldehyd, látka, která se považuje za karcinogenní. Mezi jedovaté plyny se řadí i kyanovodík, který je jedním z nejprudších a nejrychleji působících jedů [22].

2.4.3 Nitrosaminy

Tato skupina látek se považuje za nejvýznamnější skupinu škodlivých látek tabákového kouře. S největší pravděpodobností jsou odpovědné za vzniky rakovinových bujení v plicích. Tyto látky jsou součástí i běžně přijímaných potravin. Denně jich člověk zkonsumuje asi 1 mg, ovšem kuřák, který vykouřil celou krabičku, pak přijal zhruba 17 mg těchto látek. Nitrosaminy, které byly identifikovány v cigaretovém kouři jsou například N-nitrosornikotin (NNN), 4-(methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), N-nitrosoanatabin (NAT), N-nitrosoanabasin (NAB) a další [22].



Obrázek č. 5: N-nitrosornikotin [23]

2.4.4 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou rovněž považovány za sloučeniny odpovědné za vznik rakoviny. V organismu jsou metabolizovány na látky, které mají prokancerogenní účinky. Z chemického hlediska to jsou molekuly obsahující kondenzovaná aromatická jádra bez žádných heteroatomů nebo substituentů. V cigaretovém kouři byly objeveny například benzo(a)pyren, benzo(e)pyren, chrysen, 5-methylchrysen, dibenzo(h)antracen, benzo(b)fluorantren, benzo(j)fluorantren, indeno(3-cd)pyren a další podobné látky. Nejvíce obsažený je benzo(a)pyren, z jedné vykouřené cigarety ho kuřák přijme asi 20 ng. Tyto látky mohou ohrozit zdravý vývoj plodu a přispívají k možnému vzniku karcinomu [22].

2.4.5 Těžké kovy

Nejnebezpečnějšími kovy obsažených v cigaretovém kouři jsou nikl, kadmium a také arsen. Kovy se do cigarety dostanou prostřednictvím tabáku, kam se dostaly z půdy, kde tabák vyrůstal. Často je to prostřednictvím různých umělých hnojiv a zemědělských postřiků. Niklu bylo v kouři z jedné cigarety objeveno 40 - 580 ng. Při dlouhodobé expozici nízkými koncentracemi kadmia jsou v ohrožení ledviny, vyšší expozice způsobují porušení metabolismu vápníku, hyperkalciurii a tvorbu ledvinových kamenů. Cigarety obsahují také radioaktivní polonium, zdrojem je nejspíše opět půda. V jedné cigaretě je množství polonia odpovídající radioaktivitě 16,6 mBq [22].

2.4.6 Dehet

Jako dehet se označují malé pevné částice, díky kterým je vidět vznikající kouř hořícího tabáku. 1 cm³ cigaretového kouře obsahuje asi 50 miliard těchto malinkých částic. Tyto částice se díky své velikosti, respektive malosti, dostávají až do plicních sklípků, kde se

usazují a vytváří černý lepkavý materiál a vytváří černou barvu kuřákových plic. Silný kuřák může za půl roku každodenního kouření vzdechnout až tři čtvrtě kila těchto částic. Sice většinu z nich vykašle, značná část se v plicích usazuje natrvalo [22].



Obrázek č. 6: Plíce nekuřáka a kuřáka [22]

2.5 Pasivní kouření

Vdechování cigaretového kouře je škodlivé jak pro kuřáky, kteří ho produkují, tak i pro všechny v jejich okolí. Přitom většina kouře nejde do kuřákových plic, respektive tam nezůstane, jde do vzduchu, kde je dostupný i pro ostatní lidi, kteří vůbec nekouří. Když někdo kouří cigaretu, tak i z hořící cigarety stále uniká kouř do ovzduší. Kouř může zůstat ve vzduchu až 2,5 hodiny, a to i když je například v místnosti pootevřené okno. Přitom tento škodlivý produkt není po určité době ani vidět a u někoho ani cítit. Pasivní kouření poškozuje organismus, protože kouř, jak už je známo, obsahuje více než 4 000 chemických látek, z nichž jsou mnohé toxiny a některé prokazatelné karcinogeny. Například jen v USA pasivní kouření způsobuje úmrtí 34 000 osob na srdeční choroby a 7 300 na rakovinu plic [24]. Pasivní kouření je nebezpečné ze všech forem tabáku, to znamená z cigaret, baleného tabáku, doutníků, dýmkového tabáku, nebo tabáku pro vodní dýmky. Časté vystavování pasivnímu kouření může zvýšit vznik rakoviny plic, dále ischemické srdeční choroby nebo cévní mozkové příhody. V zemích, kde je kouření zakázáno ve všech veřejných prostorách, například výrazně poklesl výskyt případů akutních myokardu u obyvatel do věku 60 let [25,26].

Velmi nebezpečné je pasivní kouření pro děti, které navíc ani nemůžou ovlivnit, jestli mu budou vystaveni nebo ne. Jejich organismus je stále ve vývoji a dýchací frekvence je větší než u dospělých [24]. U matek, které kouří, je pro jejich děti dvakrát pravděpodobnější syndrom náhlého úmrtí kojence. Dále u těchto dětí může docházet k rozvoji astmatu, vzniku závažných respiračních problémů jako je zápal plic, zánět průdušek a různá infekční onemocnění dýchacích cest, častý kašel a nachlazení. Další problémy mohou být zápal mozkových blan, infekce středního ucha, která v nejhorších případech může způsobit i ztrátu sluchu. U dětí, které vyrůstají v kuřáckém prostředí, je třikrát větší pravděpodobnost že začnou samy kouřit i z psychologického hlediska. To, co vidí doma, považují pak za naprosto přirozené [25].

2.6 Odvykání kouření

Odvykání příjmu nikotinu může trvat velice dlouho a projevuje se symptomy, které jsou často popisovány jako hlavní překážka při tomto snažení. Abstinenční příznaky po nikotinu mohou začít během několika hodin po poslední cigaretě, patří mezi ně hlavně podrážděnost, poruchy spánku, zvýšená chuť k jídlu. Intenzita těchto příznaků vyvrcholí během prvních několika dnů a ustupovat můžou velmi pomalu, několik týdnů, pro některé jedince i několik měsíců i déle. I když člověk překoná abstinenční příznaky z farmakologického hlediska, další ovlivnění nastává psychické, kdy například při pohledu na cigaretu si vzpomenou na rituál zapálení, potáhnutí, držení cigarety. Tyto pocity mají spojeny s příjemnými účinky kouření. Bezdýmové nikotinové výrobky mohou pomoci při tělesných abstinenčních příznacích, ale chuť po samotné cigaretě často přetrvává [13].

2.7 Náhradní nikotinová terapie

Náhradní nikotinová terapie slouží ke snižování abstinenčních příznaků, které jsou vyvolány u kuřáků, kteří najednou přestali kouřit nebo se snaží kouření omezit. Díky snížení fyzických abstinenčních příznaků se pak jedinec může soustředit na zvládání psychosociálních aspektů kouření.

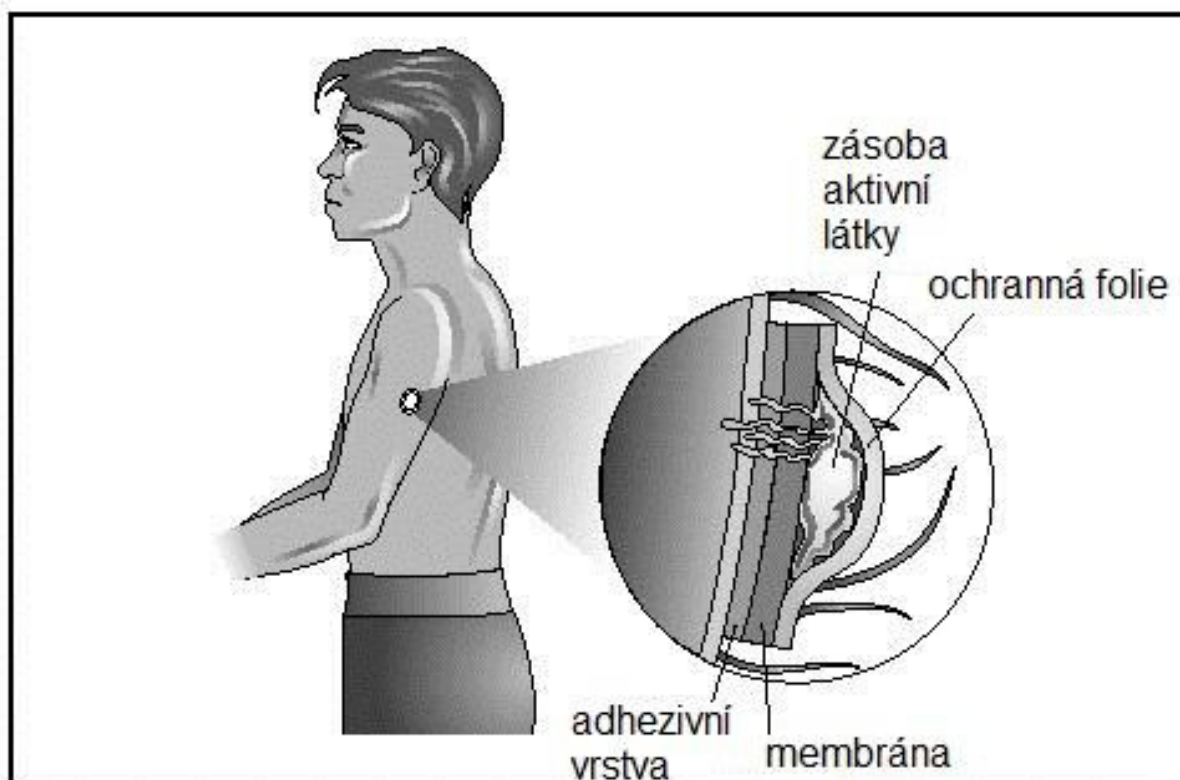
Náhradní nikotinová terapie zvyšuje šanci pro trvalé skončení s kouřením. Míra úspěšnosti této léčby je 17 %, u podávaného placeba je úspěšnost 10 % [27].

Žádný z výrobků obsahujících nikotin, který se k odvykání kouření používá, není výhradně doporučen jako nejlepší. Proto je na každém jedinci, aby si vybral takový druh, který mu bude vyhovovat. Těhotné ženy, osoby s onemocněním srdce, cukrovkou, onemocněním jater nebo ledvin a děti ve věku 12 - 18 let se vždy musí poradit s odborníkem, jestli je pro ně vhodné tyto přípravky vůbec užívat a v jakých množstvích [28].

2.7.1 Nikotinové náplasti

Nikotin se rozpustí v polymerní matrici a nanese se adhezní vrstva, která je v přímém kontaktu s kůží. Někdy je polymerní vrstva využita zároveň jako adhezní vrstva. Přidáním změkčovadel do polymerních směsí, ze kterých se náplasti vyrábějí, umožňují rychlejší uvolňování nikotinu v důsledku jejich hydrofility. V těchto transdermálních náplastech působí přítomné polymery jako tlakové lepidlo, náplasti jsou pak schopné držet na kůži pod lehkým tlakem a odstranění je bez známek viditelných lepivých zbytků [29].

Nikotinové náplasti se aplikují na kůži obvykle jednou denně, pokud možno ve stejnou dobu. Nikdy by se jich nemělo aplikovat několik najednou. Je také vhodné střídat místa pro nalepení, aby nedocházelo k místnímu podráždění kůže. Náplasti jsou k dostání s různými koncentracemi nikotinu a pro různou délku uvolňování. Náplast se může nosit i při sprchování nebo koupání. Používání nikotinových náplastí může způsobovat nežádoucí účinky, jako jsou závratě, bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, průjem či zarudnutí a otok v místě podání [30]. Oproti výrobkům dodávaných orálně, je množství nikotinu uvolňovaného z náplastí pomalé, ale konstantní [31].



Obrázek č. 7: Struktura nikotinové náplasti [32]

2.7.2 Nikotinové žvýkačky

Nikotinové žvýkačky patří do skupiny léčiv v odvykání kouření, používají se ke zmírnění touhy po nikotinu.

Od svého uvedení na trh, které v Evropě proběhlo před 28 lety, v USA až před 24 lety, se složení žvýkaček nezměnilo. Pouze se od té doby vylepšují organoleptické vlastnosti, jako například různé příchutě. Nevýhoda žvýkaček je dostupnost nikotinu, který je uvolňován poměrně pomalu, takže se u pacientů nedostavuje rychlá úleva [33].

Na českém trhu jsou k dostání žvýkačky Nicorette s koncentrací nikotinu 2 a 4 mg. Jako léčivá látka je uvedena „nicotiny resinos“ 20 mg (odpovídá 4 mg nikotinu). Pomocné látky pro výrobu žvýkaček jsou: základ žvýkáci gumy s antioxidantem (obsahuje butylhydroxytoluen E321), xylitol, silice máty peprné, uhličitan sodný, draselná sůl acesulfamu, levomenthol, oxid hořečnatý, mastek, dusík, ovocné aroma v prášku, čištěná voda, polysorbát, sukralóza, hydroxypropylmethylcelulóza, arabská klovatina, oxid titaničitý, karnaubský vosk a hlinitý lak chinolinové žluti. Silnější žvýkačky se používají na začátku odvykání kouření, po čase se mohou vyměnit za žvýkačky s nižší koncentrací nikotinu [34].

Žvýkat by se měly pomaleji, doporučováno je vždy žvýkat pár sekund, poté žvýkačku přesunout pod jazyk nebo ke tvářím a minutu až dvě odpočívat. Takto se doporučuje pokračovat třicet minut. Léčba závislosti na nikotinu pomocí žvýkaček trvá obvykle okolo 12 týdnů. Během této doby by se měl postupně snižovat počet přijatých žvýkaček za den, podle subjektivní potřeby zapálit si cigaretu. Pokud pacientova spotřeba klesne na 1 - 2 žvýkačky za den, je vhodné léčbu ukončit. Všeobecně se nedoporučuje užívat žvýkačky déle jak 6 měsíců [34].



Obrázek č. 8: Nikotinové žvýkačky [35]

2.7.3 Nikotinové pastilky a mikrotablety

Na českém trhu jsou k dostání pastilky Nicorette Mint, které obsahují 2 nebo 4 mg nikotinu, silnější koncentrace je opět vhodná pro kuřáky podléhající nikotinové závislosti vysokého stupně, nižší koncentrace pro nižší stupně závislosti. Léčivou látkou je nikotin ve formě nikotin - resinátu. Pastilka je oválného tvaru, v barvě bílé až téměř bílé. Vkládá se do úst a nechá se volně rozpustit. To může trvat i 20 minut. V jádře pastilky je obsaženo: mannitol, xanthanová klovatina, vysušené složené mentholové aroma (arabská klovatina, aroma máty peprné, mentholové a cineolové), uhličitan sodný, sukralosa, draselná sůl acesulfamu, magnezium-stearát. V potahové vrstvě jsou: hypromelosa, složené tekuté mentholové aroma (aroma mátypeprné, mentholové a cineolové), oxid titaničitý, sukralosa, leštidlo sepifilm, hypromelosa, mikrokrytalická celulóza, hlinitokřemičitan draselný, oxid titaničitý, draselná sůl acesulfamu, polysorbát [36].

Bukální podávání léčiv může ovlivňovat biologickou dostupnost přípravku. Mikrotableta může být spolknuta dříve, než v ústech dojde k potřebné absorpci. Změnou formulace pomocné látky je možné ovlivňovat dodávání nikotinu, díky modulaci postupného uvolňování. Jako bioadhezivní polymery se pro tyto tablety uplatnily karbomer a alginátové sodné soli [37].

2.7.4 Orodispergovatelný film

Německý výrobek NiQuitin Mint neboli orodispergovatelný film, je tenký proužek obsahující nikotin pro rychlou úlevu od chuti na cigaretu. Vkládá se do úst na jazyk a přitiskne se na patro. Rozpuštění filmu v ústech trvá asi 3 minuty. Jeden film obsahuje malé množství ethanolu (méně než 100 mg). Léčivou látkou je nicotinum 2,5 mg v jednom balení. Každý film je zabalen v samostatném sáčku. Pomocnými látkami jsou kromě 96% ethanolu kopolymer MA/EA (1 : 1), typ A, triethyl-citrát, aroma máty peprné, sukralosa a hydrogenuhličitan sodný [38].

2.7.5 Nikotinové spreje

Spreje s obsahem nikotinu účinkují velmi rychle po podání při touze po cigaretě a ke zmírnění abstinčních příznaků nedostatku nikotinu. Obvykle vystačí 1 - 3 vstříky k momentálnímu uspokojení. Sprej by měl být k léčbě závislosti používán po dobu tří měsíců, neměl by být užíván déle jak šest měsíců. Užívání nikotinového spreje může být doprovázeno stejnými nežádoucími účinky jako jiné formy nikotinu. Nežádoucí účinky závisí na výši užívané dávky. Po ukončení léčby se mohou objevit v ústech vředy. Složení nikotinového spreje Nicorette, je kromě účinné látky nikotinu (ve formě nicotinum), propylenglykol, bezvodý ethanol, trometamol, poloxamer 407, glycerol, hydrogenuhličitan sodný, levomenthol, mátové aróma, chladivé aróma, sukralóza, draselná sůl acesulfamu, kyselina chlorovodíková (k úpravě pH) a čištěná voda [39].



Obrázek č. 9: Nikotinový sprej pro zahnání abstinčních příznaků po nikotinu [40]

2.7.6 Elektronické cigarety

Pro elektronické cigarety se uchylují často kuřáci, kteří chtějí kouřit zdravějším způsobem, nebo i při odvykání kouření, kdy mohou postupně snižovat množství nikotinu. Důležitou volbou pro přechod z klasických cigaret na elektronické je vhodná volba koncentrace nikotinu v náplni. Nikdy se z náplně neabsorbuje všechno nikotin, ale jen asi 40 až 65 %, podle způsobu kouření každého jedince.

Nejvyšší existující koncentrace nikotinu v náplních do elektronických cigaret je $36 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tuto koncentraci využívají většinou lidé s velmi vysokou závislostí, kouřící více než dvě krabičky denně. Pro silné kuřáky, kteří kouří zhruba krabičku za den, je vhodná náplň s koncentrací nikotinu $24 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Další úrovně jsou 16 a $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ vhodné například pro kuřáky, kteří kouřili zhruba také krabičku cigaret denně, ale lehčích cigaret. Další úrovně jsou $12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pro osoby, které nikotin vyžadují, ale přitom na něm nejsou závislí. Nejmenší koncentrace v náplních je $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tu vyhledávají lidé, kteří si chtějí vychutnat pouze nejmenší možné množství nikotinu. Poslední možností je varianta náplně bez jakéhokoliv nikotinu. Ta je hlavně pro ty, kteří už přestali kouřit kvůli závislosti na nikotinu, ale mají potřebu kouřit jako činnost, vkládat něco do úst, potáhnout a vyfouknout dým.

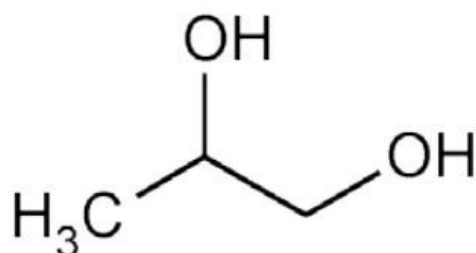
Dalším kritériem pro výběr síly tekuté náplně může být fakt, jestli chce uživatel elektronické cigarety párkrát potáhnout a stačí mu to, nebo jestli ji u sebe bude mít celý den a potahovat co chvíli. V prvním případě je lepší zvolit silnější koncentraci nikotinu v náplni, v druhém

případě je naopak vhodné zvolit slabší sílu náplně, aby nedošlo ke zbytečnému předávkování nebo narůstání nikotinové závislosti. Další volba může být rozhodování, v kterou denní dobu zvolit jakou sílu nikotinu. Například ráno po probuzení bude kuřák vyžadovat vyšší sílu nikotinu než třeba po jídle. Každý nový kuřák elektronických cigaret si musí sám najít takové kombinace, které mu budou vyhovovat [41]. Závislost na nikotinu obsaženém v elektronických cigaretách může být menší než na nikotinu z tabákových výrobků [42].

2.7.6.1 Složení tekuté náplně do elektronické cigarety

Nejdůležitější přísady, které jsou v každé náplni, je změkčovadlo, ochucovadlo a nikotin. Jako změkčovadlo se využívá propylenglykol a glycerin. Někdy je to pouze samotný propylenglykol [3]. Ochucovadla jsou důležitá pro výslednou chuť, používají se tabákové příchutě, které nejvíce napodobují klasické cigarety, dále různé příchutě jako menthol, jahoda, banán, čokoláda, kávé, vanilka a podobně. Nikotin se standardně přidává v koncentraci 0 - 24 mg·ml⁻¹ [23].

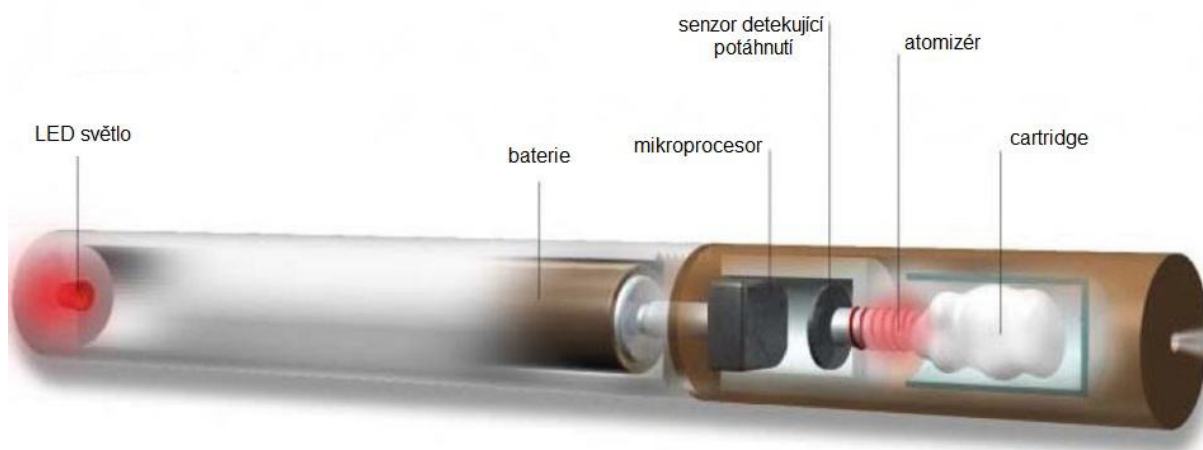
Zvýšená expozice propylenglykolu může způsobit podráždění očí a dýchacích cest. Opakované a časté vdechování v průmyslových zařízeních může mít vliv na CNS a chování. Například americká vláda varuje před používáním propylenglykolu v divadelních mlhách, a to kvůli možnému riziku podráždění očí a dýchacích cest. Při zahřátí a vypaření propylenglykol přechází v propylenoxid. Glycerol tvoří akrolein, který může způsobovat podráždění horních cest dýchacích [3].



Obrázek č. 10: Propylenglykol [23]

2.7.6.2 Princip fungování elektronické cigarety

Elektronická cigareta je malé zařízení, které slouží k inhalaci vzniklé páry. Pro správné fungování potřebuje několik částí. Jsou to baterie, atomizér, zásobník na kapalnou náplň a samotná náplň. Do zásobníku, nazývaného též cartridge, se nakape tekutá náplň, která je přiváděna prostřednictvím svého materiálu k atomizéru. Tekutá náplň, označovaná také jako liquid, obsahuje nikotin a může být doplněna nejrůznějšími příchutěmi. Atomizér je ovládán mikroprocesorem a funguje jen se zdrojem elektrického napětí, což obstarává baterie. Ty jsou dobíjecí a rozdělují se na automatické a manuální. U automatických dojde k sepnutí při potažení z e-cigarety, kdežto u manuálních musí uživatel nejdříve stisknout tlačítko pro aktivaci a až pak potáhnout. Atomizér je spirálka z odporového drátku, která se po sepnutí baterie rozžhává a z náplně začne odpařovat páru, kterou uživatel vdechuje. Na konci e-cigarety je diodové světlo, které se při potáhnutí plynule červeně rozsvítí pro uživatelský efekt pravého kouření [43,44].



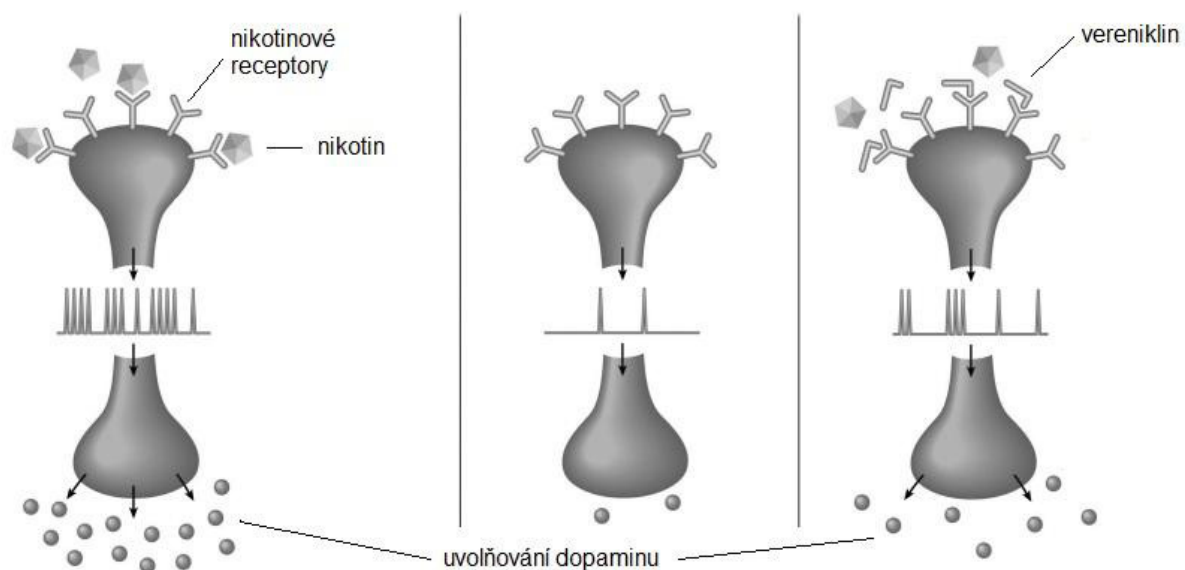
Obrázek č. 11: Schéma elektronické cigarety [45]

2.8 Beznikotinová terapie

Jiný způsob na odvykání kouření jsou léky, které byly vyvinuty k tomuto účelu, a přitom neobsahují žádný nikotin. První takové vyrobené léčivo je vareniklin. Studie ukázaly, že s těmito léky je čtyřikrát častější úspěšnost v léčbě. Léky jsou ovšem na lékařský předpis, kdežto výrobky s nikotinem jako žvýkačky, náplasti, spreje a podobně jsou v lékárně volně prodejné výrobky [28].

Vareniklin má samozřejmě jako většina jiných léků i nežádoucí účinky, hlavně na srdce a cévy. Mezi závažné patří mírně zvýšené riziko kardiovaskulárních příhod. Výbor pro humánní léčivé přípravky Evropské lékové agentury zkoumal poměr přínosů a rizik tohoto léčiva a vyhodnotil, že přínos ukončení kouření převažuje nad mírně zvýšenými riziky kardiovaskulárních příhod. Těmito riziky ovšem trpí samotní kuřáci, a na úroveň rizika nekuřáků se vrací až po pěti letech od ukončení kouření, takže se toto riziko bere s porovnáním dlouhodobého ukončení kouření jako přípustné. Od roku 2006 je používán v USA, v Evropě byl tento lék registrován v roce 2007 [46].

Vareniklin je parciální agonista acetylcholin-nikotinových receptorů, hlavně subtypu $\alpha 4\beta 2$, které jsou typické pro silně závislé kuřáky. Navázáním na nikotinové receptory dojde k zabránění abstinčním příznakům, protože dochází, sice v menší míře než po navázání nikotinu, k vyplavení dopaminu. Pokud by si pacient po užití toho léku přesto zapálil cigaretu, nedošlo by u něj k pocitům uspokojení, protože nikotinové receptory jsou už obsazené vareniklinem [47,48]. Schématické znázornění účinku na receptory je znázorněno na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12: Znázornění působení nikotinu z cigaret, absence nikotinu a vareniklinu na nikotinové receptory [48]

2.9 Metody stanovení nikotinu

2.9.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je dnes velmi oblíbená analytická metoda. Základem je rozdělení směsi mezi dvě fáze na základě určitých vlastností, např. polarity, náboje nebo velikosti. Velkou výhodou kapalinové chromatografie je fakt, že vzorek není potřeba převádět na plynnou fázi, a tím nedochází ke ztrátě těkavých a tepelně nestálých sloučenin.

Základem vysokoúčinné kapalinové chromatografie se stalo klasické kolonové uspořádání, které ovšem nemělo dostatečnou účinnost. Proto je potřeba použít malých zrníček sorbentu, umístěných v koloně, přes které prochází kapalná mobilní fáze. Vzhledem k značnému odporu malých částic je potřeba pracovat za vysokého tlaku [49,50].

Pro vyhodnocení mohou být použity různé typy detekce. UV-VIS spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v dané oblasti vybrané vlnové délky, PDA detektor umožňuje proměřit celé spektrum současně. To má výhodu, že se analýza nemusí opakovat při změně vlnové délky. Fluorescenční detektor měří míru fluorescence, tzn. emitované světlo vyzářené analytem po předchozí excitaci. Hmotnostní detektor detekuje analyty na základě jejich poměrů hmotnosti a náboje. Získané informace slouží k identifikaci látky [51].



Obrázek č. 13: Sestava HPLC/PDA

Pro současné stanovení nikotinu a jeho metabolitů v různých biologických vzorcích bylo vypracováno několik metod se spojením s kapalinovou chromatografií.

2.9.1.1 HPLC s fluorescenční detekcí

Možná metoda je pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, kdy byly analyty extrahovány z lidského séra extrakcí do chloroformu a poté zpětně do okyselené vodné fáze. Jako stacionární fáze byla pro separaci použita reverzní fáze C18 o parametrech 4,6 mm x 150 mm, velikost částic 5 μm , mobilní fáze byla 0,1 M octan sodný (pH 4) a acetonitril v poměru 8:2. Nastavení průtoku mobilní fáze bylo rychlostí 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Separace probíhala za laboratorní teploty. Vlnová délka byla nastavena pro excitaci na 333 nm a pro emisi na 424 nm [52].

2.9.1.2 HPLC s UV-VIS detekcí

Pro analýzu nikotinu z mozkové tkáně byla použita metoda HPLC s UV-VIS detekcí. Stacionární fáze byla fenyl-hexylová kolona 150 mm x 4,6 mm. Mobilní fáze sestávala z acetonitrilu, methanolu a 20 mM dihydrogenfosforečnanu sodného v poměru 55:45:900 (pH bylo upraveno na 5,1 pomocí kyseliny fosforečné). Analýza probíhala za laboratorní teploty, průtok byl nastaven na 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a vlnová délka pro detekci byla zvolena 260 nm [53].

Další metoda byla nalezena pro stanovení čisté formy nikotinu a různé lékové formy. Použitá stacionární fáze byla Hypersil C18 BDS, 250 x 4,6 mm s velikostí částic 5 μm . Mobilní fáze byla zvolena fosfátový pufr (pH 6,8) a methanol v poměru 35:65. Vlnová délka byla nastavena 259 nm. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota byla zvolena 35 $^{\circ}\text{C}$ [54].

2.9.1.3 HPLC s hmotnostní detekcí

Při měření nikotinu z moči novorozenců byla využita metoda kapalinové chromatografie s MS/MS detekcí. Pro separaci byla použita stacionární fáze Zorbax Eclipse C18 150 mm x 2 mm, 4 μm , mobilní fáze byla nastavována gradientově s roztoky

10 mM octanu amonného (pH 6) a acetonitrilu s 0,01% kyselinou mravenčí. Průtok byl nastaven na $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a probíhal za laboratorní teploty [55].

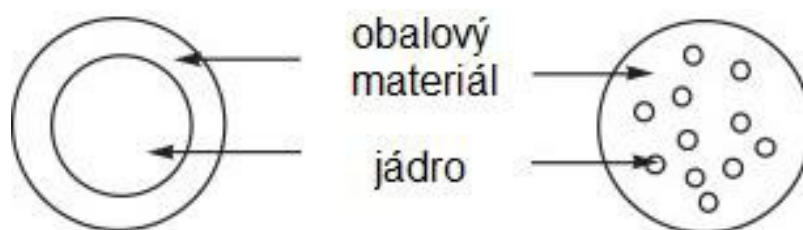
2.9.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro detekci nikotinu v tabákových listech se může využít plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Metoda vykazuje vysokou citlivost. Tabákové listy se extrahují methanolem s pomocí ultrazvuku, po filtraci se podrobí analýze [56].

2.10 Enkapsulace

Enkapsulace je proces, kdy se aktivní látka zachytí do vhodného nosného materiálu a může pak dojít k lepšímu poskytnutí a využití biologicky aktivních molekul nebo i živých buněk. Tato metoda vznikla asi před 60 lety, a dnes už jde definovanými podmínkami ovlivňovat rychlost uvolňování zapouzdřeného obsahu [57].

Pro použití v potravinářství musí být i nosný materiál potravinářské kvality, musí být biologicky rozložitelný a být schopný tvořit bariéru mezi vnitřním obsahem a okolím. Nejčastěji se používají polysacharidy, ale vhodné mohou být i bílkoviny nebo lipidy. Ve většině případů se technologicky využívá metoda, kdy je aktivní látka zcela obalena a kryta bariérou a z nosného materiálu nevystupuje [58]. Druhý často používaný typ je, když je v jedné matrix částici vloženo několik jader enkapsulované sloučeniny. Pro ilustraci je srovnání uvedeno na obrázku č. 14. Vyráběné částice, nazývané také jako kapsle, mají obvykle několik nm až mm [58].

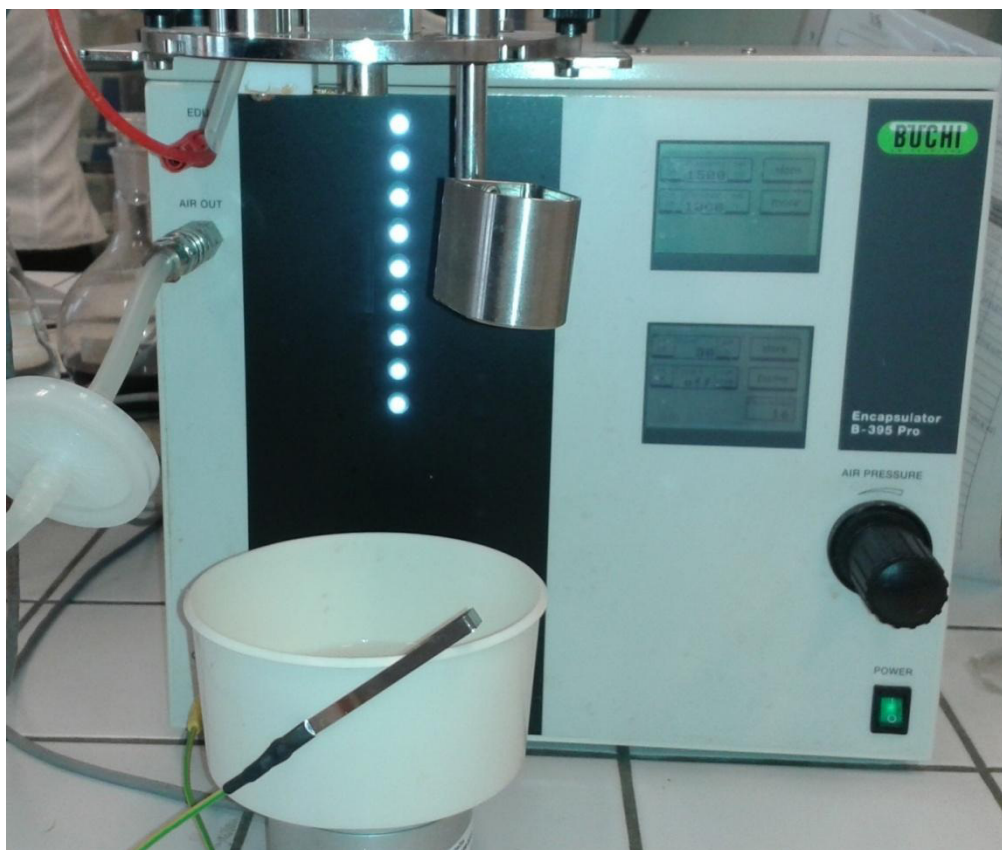


Obrázek č. 14: Dvě hlavní možné formy zapouzdření [57]

2.10.1 Princip enkapsulátoru

Látka, která má být enkapsulována, se smíchá se zapouzdřovacím polymerem a tato směs se aplikuje do stříkačky nebo do tlakové láhve. Odtud je pak stříkačkovým čerpadlem nebo tlakovým vzduchem vháněna do pulzační komory. Kapalina prochází přes trysku o definovaném průměru a na výstupu z trysky vznikají kapičky o stejné velikosti. Tyto kapičky získají na cestě mezi tryskou a elektrodou v elektrickém poli povrchový náboj a elektrostatické odpuzivé síly tak způsobí rozptýlení kapiček dopadajících do vytvrzovacího roztoku. Velikost vzniklých částic ovlivňují různé parametry jako frekvence vibrací, amplitudy, velikost trysky, rychlost průtoku, fyzikální vlastnosti směsi produktu s polymerem. Tvorba perliček se může pozorovat a optimalizovat v reálném čase ve světle stroboskopické lampy. V enkapsulátoru může vznikat 50 až 5000 perliček za sekundu, které jsou jímány do vytvrzovacího roztoku v reakční nádobě, ve které je roztok stále míchán magnetickým míchadlem, aby se zabránilo shlukování kuliček. Reakční nádoba musí být také uzemněna.

Všechny součásti přístroje, které docházejí do přímého kontaktu s částicemi, je možné autoklávováním sterilovat [59].



Obrázek č. 15: Enkapsulátor B-395 Pro

3 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení koncentrace nikotinu a zároveň srovnat obsah nikotinu v různých druzích výrobků, jako jsou náplně do elektronických cigaret, žvýkačky, ústní sprej, šňupací tabák ale i klasická cigareta.

Hlavní dílčí cíle práce jsou:

- rešerše zaměřená na přehled přípravků obsahujících nikotin a metody jeho analýzy
- zavedení a optimalizace metody izolace a analýzy nikotinu v různých typech matric
- experimentální studie – srovnání obsahu nikotinu v různých druzích potravinářských a tabákových výrobků
- vyhodnocení výsledků a diskuse

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje, chemikálie a materiál

4.1.1 Přístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)

Magnetická míchačka Lavat (ČR)

Enkapsulátor B-395 Pro - Büchi (Švýcarsko)

Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonoplus (SRN)

Mikrocentrifuga Mikro 200 Hettich Zentrifugen (SRN)

Vortex - Genius 3, IKA Vortex (SRN)

Vakuová odparka – IKA Werke R V06-ML (SRN)

Inkubátor Memmert INB 400 (SRN)

Sestava HPLC/PDA ThermoFisher Scientific (USA):

- Programátor gradientu UltiMate 3000
- Fotometrický detektor: UltiMate 3000 DAD
- Pumpa: LPG-3400SD
- Kolona: Kinetex 5u C18 100 A 150 x 4,6 mm
- Kolona: Kinetex 2,6u HILIC 100A 150 x 4,6 mm
- Vyhodnocovací software: Chromeleon 7

Sestava HPLC/PDA ThermoFisher Scientific (USA):

- Programátor gradientu GR 5
- Vysokotlaké čerpadlo typ P 4020
- Dávkovací ventil typ C
- Termostat kolony LCO 101
- Kolona: Agilent Eclipse XDB- C18 5 μ m 150 x 4,6 mm
- Vyhodnocovací software: Xcalibur

4.1.2 Použité chemikálie

-(-)nicotine $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich (SRN)

Methanol pro HPLC, Gradient Grade - Sigma-Aldrich (SRN)

Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade - Sigma-Aldrich (SRN)

Ethanol - Vitrum–LachNer (ČR)

Kyselina chlorovodíková, 35 % - Vitrum–LachNer (ČR)

Kyselina octová, 98 % - Vitrum–LachNer (ČR)

Chitosan z chitinu - Sigma–Aldrich (SRN)

Alginát sodný - Sigma–Aldrich (SRN)

Dihydrát chloridu vápenatého - Vitrum–LachNer (ČR)

Tripolyfosfát sodný - Sigma–Aldrich (SRN)

Pankreatin z vepřové slinivky - Sigma–Aldrich (SRN)

Pepsin - Sigma–Aldrich (SRN)

Škrob - Penta (ČR)

Směs kyseliny cholové a deoxycholové - Sigma–Aldrich (SRN)

Hydroxid sodný - Vitrum–LachNer (ČR)

Diethylether - Vitrum–LachNer (ČR)

Hydrogenuhličitán sodný - Vitrum–LachNer (ČR)

Ostatní použité chemikálie byly čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

4.1.3 Materiál pro analýzu

Pro srovnání obsahu nikotinu v různých druzích výrobků, které jsou na našem trhu, byli vybráni zástupci z těchto kategorií: elektronické cigarety, žvýkačky, ústní sprej, náplasti, šňupací tabák a klasické cigarety.

4.1.3.1 Náplně do elektronických cigaret

Náplně byly vybrány podle oblíbenosti zákazníků, tudíž nejprodávanější značky a příchutě. Pro analýzu byly použity tabákové řady dvou značek s různou koncentrací nikotinu, dále sedm různých příchutí o jedné koncentraci nikotinu. Náplně značky Dekang - typ Desert Ship, byly použity o koncentracích 0, 6, 11, 16, 18 a 24 mg·ml⁻¹ (obrázek č. 16). Od firmy Joytech byl použit typ Daf o koncentracích 0, 6, 11, 16, 24 mg·ml⁻¹ (obrázek č. 16). Jako příchutě byly vybrány Blueberry, Menthol a Water meloun od firmy Dekang, dále Banana, Apple a Straw-champ od firmy Joytech a Crème caramel české značky Equites (obrázek č. 17). Všechny příchutě byly použity s koncentrací nikotinu 16 mg·ml⁻¹.



Obrázek č. 16: tekuté náplně tabákové řady značek Dekang a Joytech



Obrázek č. 17: tekuté náplně příchutě značek Dekang, Joytech a Equites

4.1.3.2 Nikotinové žvýkačky

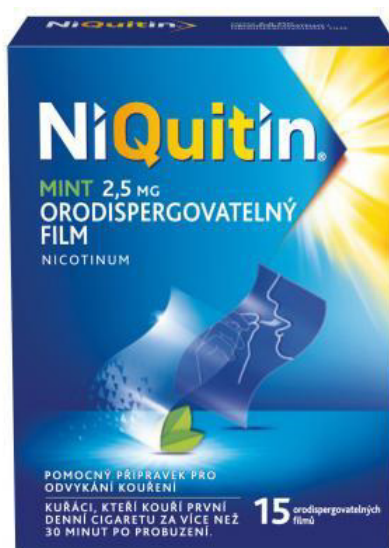
Vybrané produkty použité pro analýzu jsou žvýkačky Nicorette s příchutí menthol s koncentrací nikotinu 4 mg v jedné žvýkačce a žvýkačky Nicorette s příchutí fresh fruit s koncentrací 2 mg nikotinu na jednu žvýkačku (obrázek č. 18).



Obrázek č. 18: Žvýkačky Nicorette Icemint gum 4 mg a fresh fruit 2 mg

4.1.3.3 Orodispergovatelný film

Dalším produktem vybraný pro analýzu byl NiQuitin Mint orodispergovatelný film. Tento orodispergovatelný film je tenký proužek obsahující nikotin. Jeden film obsahuje podle údajů na obale 2,5 mg nikotinu a také i malé množství ethanolu (méně než 100 mg).



Obrázek č. 19: NiQuitin Mint orodispergovatelné filmy [38]

4.1.3.4 Nikotinové pastilky

Další z výrobků, které se používají ke zmírnění touhy po nikotinu při odvykání kouření, mohou být Nicorette Mint lisované pastilky. Existují ve variantě s 2 mg nikotinu, které jsou vhodné pro kuřáky kouřící do dvaceti cigaret denně, nebo s 4 mg nikotinu, vhodné pro těžší kuřáky. Pro analýzu byly použity pastilky s uvedeným obsahem nikotinu 4 mg.



Obrázek č. 20: Nicorette Mint lisované pastilky [36]

4.1.3.5 Nikotinový sprej

Nikotinový sprej je další z výrobků, které se používají pro okamžitý příjem nikotinu. Užívá se tak, že se najednou vstříknou až tři stříky spreje do úst. Pro analýzu byl použit sprej Nicostar s příchutí Coffee (obrázek č. 21). Výrobce je uveden obsah nikotinu 11 až 13,5 mg na celý obsah 15 ml, který by měl vystačit na cca sto stříknutí, což znamená, že v dávce tří stříknutí by měl být obsah nikotinu 0,331 až 0,405 mg.



Obrázek č. 21: Nikotinový sprej Nicostar Coffe

4.1.3.6 Šňupací tabák

Šňupací tabák je speciálně upravený nadrcený a aromatizovaný tabák. Pro analýzu byly použity dva vzorky - tabák šňupací Gletscher Prise Snuff 10g a Tabák šňupací Red Bull Strong Snuff 10g (obrázek č. 22). Obsah nikotinu není výrobcem uváděn.



Obrázek č. 22: Tabák šňupací Gletscher Prise Snuff a Red Bull Strong Snuff

4.1.3.7 Klasické cigarety

Posledním typem výrobků podrobených analýze byly klasické cigarety. Bylo použito 10 druhů. Na následujícím seznamu je za názvem v závorce uvedeno množství nikotinu, které výrobci uvádějí společně s množstvím dehtu a oxidu uhelnatého, nejspíše tedy jde o hodnotu, která se do organismu dostane až po spálení. Hodnotu nikotinu v celé nezapálené cigaretě výrobci neuvádějí.

- Marlboro red (0,8 mg)
- Winston classic (0,8 mg)
- Philip Morris Ruby (0,8 mg)



Obrázek č. 23: Marlboro red, Winston classic, Philip Morris Ruby (síla nikotinu 0,8 mg)

- Sparta classic (0,7 mg)
- Start by Chesterfield (0,7 mg)



Obrázek č. 24: Sparta classic, Start by Chesterfield (síla nikotinu 0,7 mg)

- Camel activate double (0,6 mg)
- LM loft blue (0,6 mg)
- Marlboro gold (0,6 mg)
- Davidoff shape (0,6 mg)



Obrázek č. 25: Camel activate double, LM loft blue, Marlboro gold, Davidoff shape (síla nikotinu 0,6 mg)

- Kiss superslims strawberry (0,5 mg)



Obrázek č. 26: Kiss superslims strawberry (síla nikotinu 0,5 mg)

4.2 Optimalizace stanovení nikotinu metodou HPLC/PDA

Při optimalizaci metody stanovení nikotinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl použit standard nikotinu $(-)$ -nicotine $\geq 99\%$ od firmy Sigma-Aldrich. Byla optimalizována použitá stacionární i mobilní fáze, dále průtok mobilní fáze a teplota analýzy. Cílem optimalizace stanovení nikotinu bylo vývoj jednoduché, levné, rychlé a přesné metody jeho analýzy.

4.2.1 Optimalizace vhodné stacionární fáze

K optimalizaci byly použity následující kolony:

- Agilent Eclipse XDB- C18 5 μm 150 x 4,6 mm
- Kinetex 5u C18 100 A 150 x 4,6 mm
- Kinetex 2,6u HILIC 100A 150 x 4,6 mm

4.2.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Při optimalizaci mobilní fáze bylo testováno použití vhodné organické a vodné fáze a jejich vhodný poměr. Dále byl také sledován vliv pH mobilní fáze na detekci nikotinu. K optimalizaci byl použit acetonitril, methanol, octan amonný a miliQ voda v různých kombinacích a poměrech.

4.2.3 Optimalizace průtoku mobilní fáze a použité teploty při analýze

Průtok byl optimalizován v rozmezí 0,5 - 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a při teplotě 25 a 30 $^{\circ}\text{C}$.

4.3 Optimalizace extrakce nikotinu

Při optimalizaci nikotinu z tabákového materiálu byly použity cigarety značky Winston (červené), kde je výrobcem uvedena koncentrace nikotinu 0,8 mg na jednu cigaretu. Tato hodnota je uvedena zároveň s množstvím dehtu a oxidu uhelnatého, půjde tedy o hodnotu, která se uvolní až po zapálení. S cigaretou byly prováděny metody extrakce uvedené v dalších kapitolách a bylo zjišťováno, při kterých se nejlépe uvolní nikotin, aby mohl být následně pomocí metody HPLC analyzován. I u ostatních výrobků bylo vyzkoušeno více metod, jak nikotin z výrobku uvolnit a analyzovat.

4.3.1 Příprava vzorku pro extrakci v methanolu

Obsah jedné cigarety byl ponechán v methanolu v různých časových intervalech. Ze směsi bylo odebráno malé množství vzorku, který byl centrifugován a po nastříknutí na kolonu byl sledován obsah nikotinu. Zároveň byla směs ve stejném čase také podrobena ultrazvuku po dobu 10 sekund. Časy pro sledování extrakce byly 15, 30 a 60 minut, 12, 24 a 36 hodin.

Další výrobky, které byly taktéž extrahovány do methanolu, byly žvýkačky, které byly nejprve pokrájeny na malé kousky. Dále pastilky, které byly rozdrceny na prášek. Nikotinový film a nikotinový sprej se methanolem pouze patřičně zředil.

4.3.2 Příprava vzorku pro zásaditou hydrolyzu hydroxidem sodným

Obsah jedné cigarety byl v několika různých časech louhován v 5% roztoku hydroxidu sodného. Směs byla zfiltrována a získaný roztok byl následně třikrát vytřepáný v diethyletheru. Ten byl poté na vakuové odparce odpařen a zbytek byl rozpuštěn v 5 ml methanolu. Výsledná směs byla následně vhodně zředěna methanolem a nastříknuta na kolonu.

Pro porovnání byl připraven i vzorek, kdy byl obsah jedné cigarety pouze 30 minut louhován v 5% roztoku hydroxidu sodného, zfiltrován a desetkrát zředěný methanolem.

Žvýkačky byly nakrájeny na malé kousky, pastilky rozdrceny na prášek a dále extrahovány stejným způsobem jako v případě cigaret.

4.3.3 Příprava vzorku pro kyselou hydrolyzu kyselinou chlorovodíkovou

Obsah jedné cigarety byl 60 minut louhován v 10% roztoku kyseliny chlorovodíkové. Směs pak byla zfiltrována a získaný roztok byl třikrát vytřepáný v diethyletheru, který byl poté odpařen na vakuové odparce a zbytek byl rozpuštěn v 5 ml methanolu. Výsledná směs byla potřebně zředěna methanolem a nastříknuta na kolonu.

Pro porovnání byl připraven i vzorek, kdy byl obsah jedné cigarety pouze 60 minut louhován v 10% roztoku kyseliny chlorovodíkové, zfiltrován a desetkrát zředěný methanolem.

4.3.4 Příprava vzorku pro kyselou hydrolyzu kyselinou sírovou

50 µg tabáku z cigarety bylo smícháno s 2 ml 0,1 M kyseliny sírové. Směs byla 10 sekund podrobena účinku ultrazvuku a poté ponechána 10 minut při 70°C. Po centrifugaci byl supernatant patřičně zředěný methanolem a nastříknutý na kolonu [60].

4.4 Návrh vlastního produktu s nikotinem

Mimo optimalizaci metody stanovení nikotinu a srovnání jeho obsahu v různých druzích výrobků na trhu byl v této práci navržen také vlastní produkt s obsahem nikotinu a s řízeným postupným uvolňováním v těle.

4.4.1 Příprava chitosanových částic

Pro manuální přípravu částic byly připraveny dva roztoky. Nejprve bylo připraveno 10 ml 2% roztoku chitosanu. Ten byl upraven pomocí kyseliny octové na pH 5. Z něj byl odebrán 1 ml, do kterého bylo přidáno 3 μl standardu nikotinu. Dále byl připraven srážecí roztok a to 2% tripolyfosfát sodný. Do 5 ml tohoto srážecího roztoku byl pipetou nakapán připravený chitosanový roztok s nikotinem za vzniku příslušných částic.

4.4.2 Příprava alginátových částic

Pro manuální přípravu částic byly připraveny dva roztoky. Nejdříve bylo připraveno 10 ml 2% roztoku alginátu. Z něj byl opět připraven roztok s nikotinem o koncentraci 3 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ alginátového roztoku. Dále byl připraven srážecí roztok pro alginátové částice, 2% roztok dihydrátu chloridu vápenatého. Do 5 ml tohoto roztoku byl pipetou nakapán připravený alginátový roztok s nikotinem.

4.4.3 Příprava alginát-škrobových částic

Stejným způsobem jako čistě alginátové částice byly připraveny i alginát-škrobové částice, kdy byl smíchán 0,5 ml 2% alginátu, 0,5 ml 2% roztoku škrobu a 3 μl standardu nikotinu.

4.4.4 Příprava alginátových částic pomocí enkapsulátoru

Pro enkapsulaci nikotinu do alginátových částic byl použit také přístroj Enkapsulátor Büchi B-395 Pro. Byl připraven 2% roztok alginátu a 2% roztoku dihydrátu chloridu vápenatého. Tlaková láhev byla naplněna připraveným roztokem alginátu s přídavkem definovaného množství nikotinu a přes výstup v pojistném uzávěru byla silikonovou hadičkou připojena k jednotce tvorby částic. Na silikonovou hadičku byl dále nainstalován regulační ventil průtoku kapaliny. Byla zvolena tryska o velikosti 1000 μm a připevněna na jednotku tvorby částic. Sestava byla upevněna k přístroji pomocí šroubků, vibrační jednotka byla připevněna ke krycí desce jednotky. Elektroda byla připevněna k EDU, stejně jako přívod vzduchu do tlakové láhve byl připojen k vzduchovému výstupu přístroje. Pod trysku byla na magnetické míchadlo umístěna miska s míchadélkem a polymerizačním roztokem dihydrátu chloridu vápenatého. Na okraj misky byla zaháknuta uzemňovací svorka a její konec byl ponořen do kapaliny. Byl otevřen externí přívod tlakového vzduchu a regulováním tlakového ventilu a ventilu průtoku kapaliny byl spuštěn průtok roztoku umístěného v tlakové láhvi. Na ovládacím displeji byla zapnuta regulace vibrací a frekvence; proud byl upraven tak, aby ve světle stroboskopické lampy byl patrný řetězek kapiček. Tyto kuličky byly zachytávány v polymerizačním roztoku.

4.4.5 Stanovení enkapsulační účinnosti

Po samotném vzniku částic a jejich vytvrzení ve srážecím roztoku byla proměřena koncentrace volného neenkapsulovaného nikotinu. Z rozdílu koncentrace nikotinu a jeho neenkapsulovaného množství byla dopočítána enkapsulační účinnost.

4.4.6 Stabilita částic v trávicích šťávách

Vzniklé částice byly testovány dvěma způsoby, jednak bez mechanického narušení a také s mechanickým narušením simulujícím rozžvýkání částic. Stabilita částic byla stanovena v žaludeční, pankreatické a žlučové šťávě, do kterých byly vzorky přidány. Simulace trávení probíhala nejprve v jednotlivých trávicích šťávách odděleně. Po ukončení simulovaného trávení byly vzorky centrifugovány a v supernatantu byl naměřen obsah uvolněného nikotinu.

Dále bylo také simulováno reálné trávení, kdy byly natrávené částice z žaludeční šťávy přemístěny do pankreatické šťávy a posléze i do žlučové. Vzorek byl tedy po skončení trávení v jedné trávicí šťávě centrifugován, supernatant byl použit ke stanovení koncentrace uvolněného nikotinu a k sedimentu, tedy natráveným částicím, byla přidána následující trávicí šťáva a postup byl opakován i při výměně za poslední trávicí šťávu.

V pankreatické a žaludeční šťávě byly částice ponechány po dobu 20 minut při teplotě 37 °C, ve žlučové šťávě byly částice ponechány po dobu 40 minut, taktéž při 37 °C.

4.4.6.1 Složení modelové žaludeční šťávy

Žaludeční šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody a přidáním 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové [61].

4.4.6.2 Složení modelové pankreatické šťávy

Pankreatická šťáva byla připravena rozpuštěním 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného a 0,25 g pankreatinu ve 100 ml destilované vody [61].

4.4.6.3 Složení modelové žlučové šťávy

Žlučová šťáva byla připravena z 0,8 g žlučových solí (směs kyseliny cholové a deoxycholové) ve 200 ml fosfátového pufru o pH 8 [61].

4.4.7 Stabilita částic v některých z modelových prostředí

Stabilita částic byla sledována ve dvou různých typech modelového prostředí jako optimalizace vhodného prostředí jejich uchovávání. Částice vytvořené dle kapitoly 4.5.2 byly ponechány v destilované vodě, která představovala vodnaté prostředí a v 10% roztoku ethanolu, který zastupuje alkoholové prostředí. Částice byly přidány do modelových roztoků v koncentraci 0,1 g·ml⁻¹ a po celou dobu byly uchovány při laboratorní teplotě. Stabilita byla sledována ihned po přidání do roztoku, dále po 1, 2 a 3 týdnech.

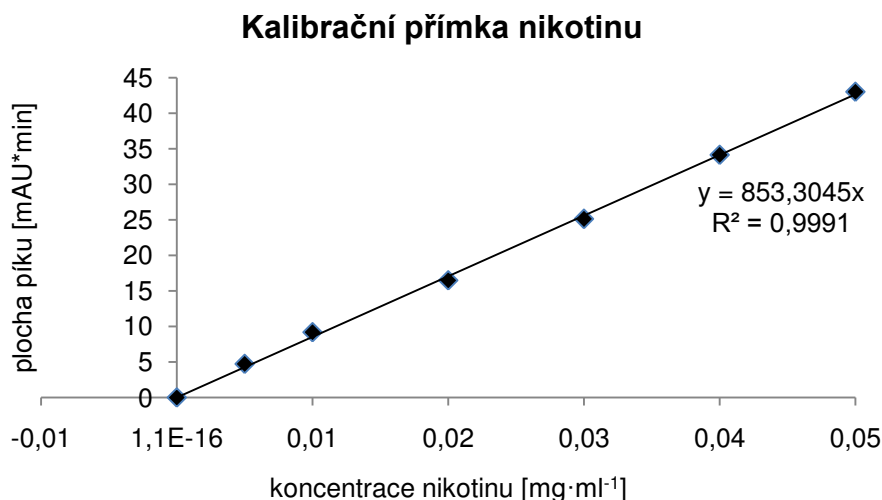
4.5 Spotřebitelský dotazník

Byl vytvořen dotazník, který byl rozdělen na tři části, aby byl zaměřený pro všechny skupiny lidí, konkrétně pro kuřáky, bývalé kuřáky i nekuřáky. Dotazník byl vytvořen pomocí webu Survio a respondenti ho vyplňovali on-line. Byl navrhnut tak, aby se zaměřil na představu lidí o jiných příjmech nikotinu, než jsou klasické cigarety, zda jsou lidé pro tyto alternativy a jestli jim pomáhají v odvykání kouření, o informovanosti lidí o nikotinu jako látce takové či jen pro představu kolik toho lidé vykouří. Jeho přesné znění je uvedeno v přílohách 2, 3 a 4.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace stanovení nikotinu metodou HPLC

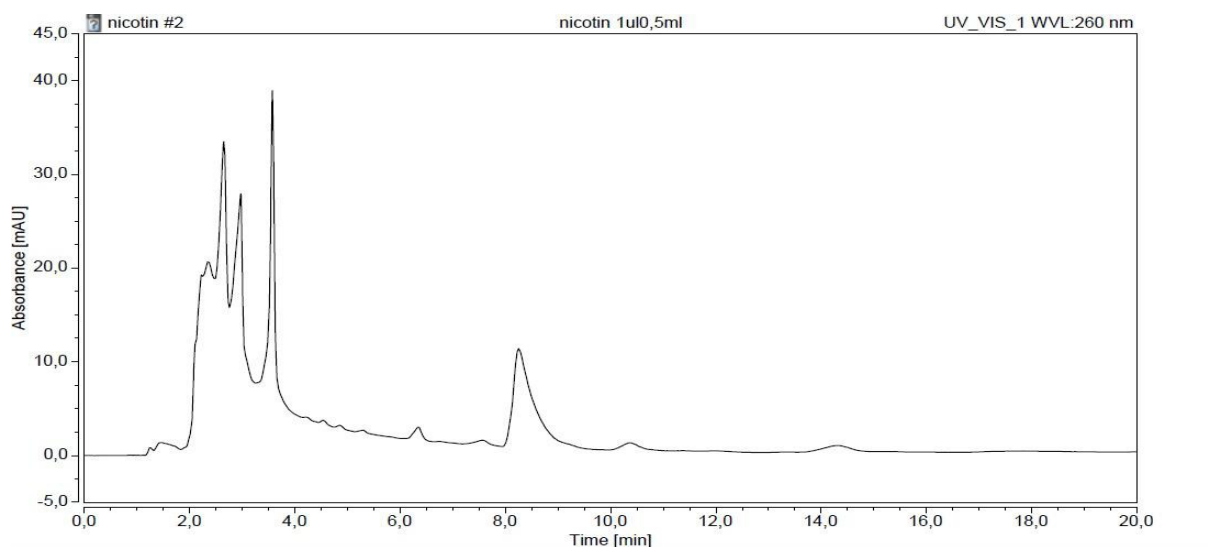
Nikotin byl analyzován metodou HPLC/PDA. Koncentrace byla zjištěna dosazením do rovnice, která byla získaná z kalibrační křivky. Ta byla sestavena pomocí přesných koncentrací standardu nikotinu od firmy Sigma-Aldrich. Kalibrační křivka nikotinu byla stanovena jako $A = 853,3045 \cdot c$.



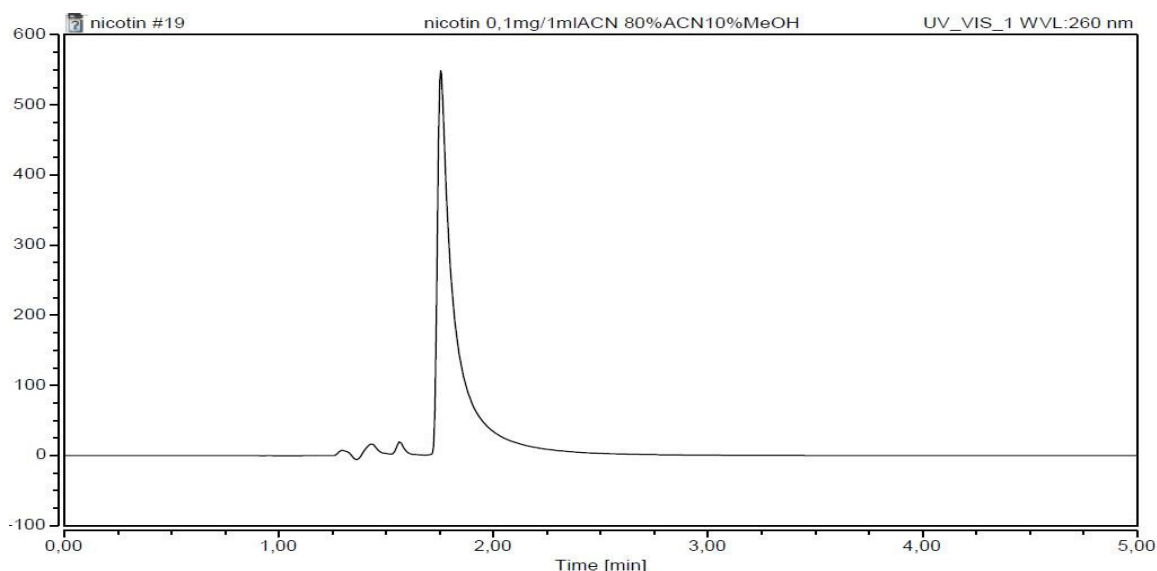
Obrázek č. 27: Kalibrační křivka standardu nikotinu

5.1.1 Výběr vhodné stacionární fáze

Za nejvhodnější byla zvolena kolona Kinetex 5u C18 100A 150 x 4,6 mm. Po nastříknutí standardu nikotinu vykazovala jasný a zřetelný pík s minimálním šumem. Naproti tomu kolony Agilent Eclipse XDB - C18 5 μ m 150x 4,6 mm a Kinetex 2,6u HILIC 100A 150 x 4,6 mm byly shledány jako nevhodné, neukazovaly jasný pík standardu. Na obrázcích 28 a 29 jsou pro srovnání uvedeny příslušné chromatogramy.



Obrázek č. 28: Použitá kolona Kinetex 2,6u HILIC 100A 150 x 4,6 mm

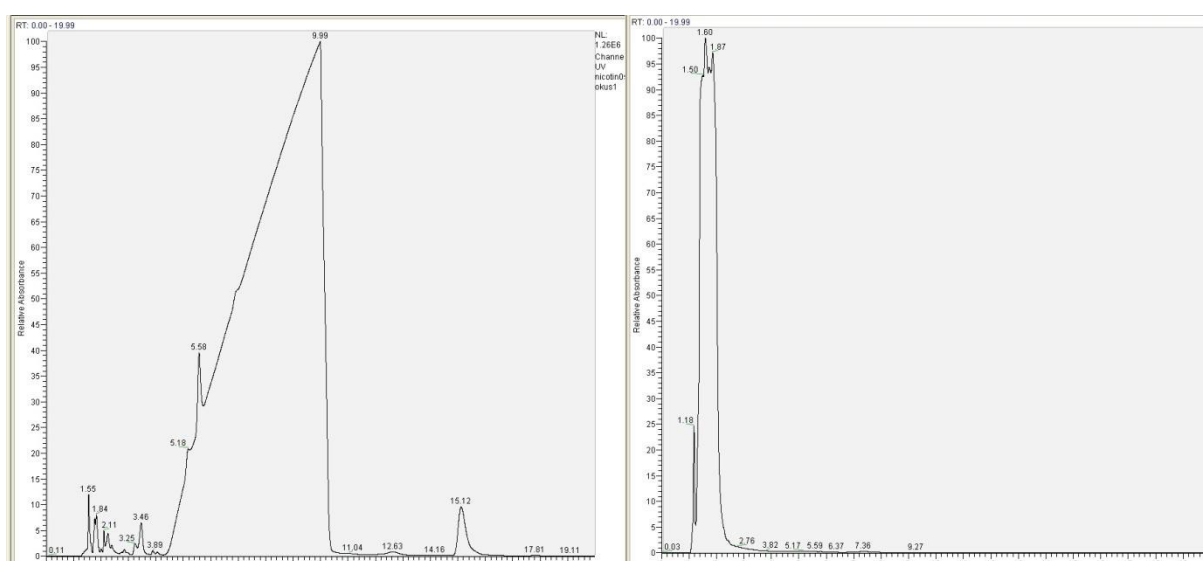


Obrázek č. 29: Použitá kolona Kinetex 5u C18 100A 150 x 4,6 mm

5.1.2 Výběr vhodné mobilní fáze

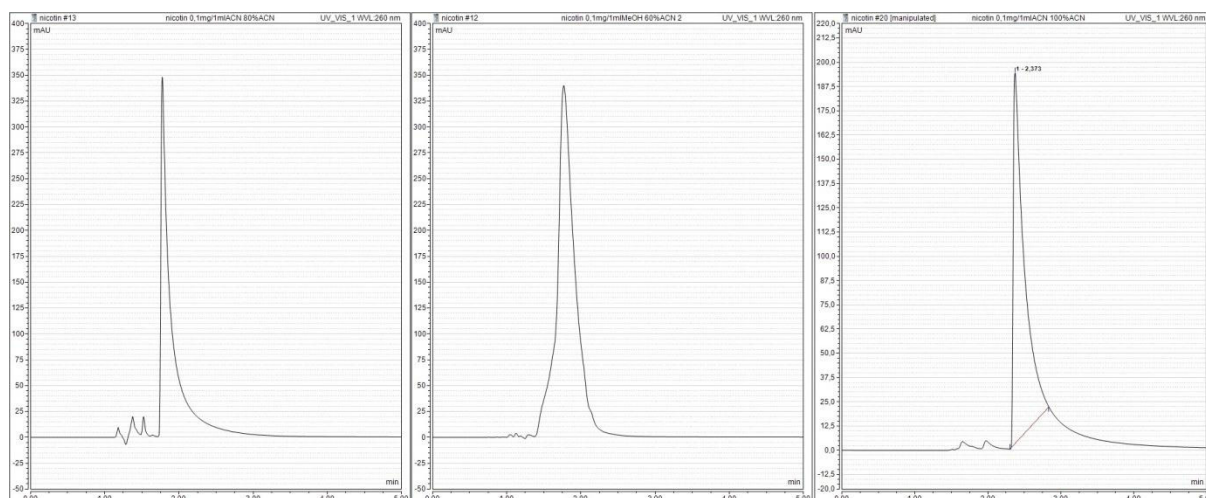
Při optimalizaci mobilní fáze bylo testováno použití vhodné organické fáze, vodné fáze a jejich vhodný poměr. Dále byl na správnou detekci nikotinu sledován vliv pH mobilní fáze. K optimalizaci byl použit acetonitril, methanol, octan amonný a miliQ voda v různých poměrech a kombinací.

Při testech vhodného pH mobilní fáze a jejího složení byl testován nejprve acetonitril a 10 mM octan amonný v poměru 2:8 (pH 9). Vzniklý pík byl nevyhovující. Při vyšším podílu organické fáze acetonitril a 10 mM octan amonný v poměru 6:4 (pH 9), byl výsledek o něco uspokojivější, ale stále nevyhovující. Rozdíl je znázorněn na obrázku č. 30. Při použití mobilní fáze o složení acetonitril a voda v poměru 6:4, byl zaznamenán lepší výsledek než při použití mobilní fáze s octanem při pH 9, viz obrázek č. 31.

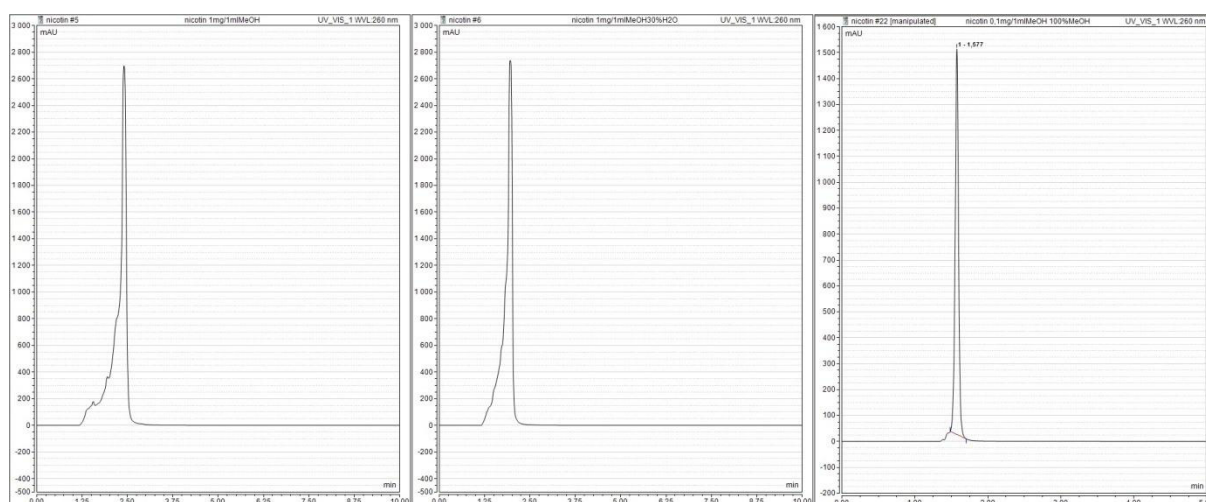


Obrázek č. 30: Použitá mobilní fáze ACN:CH₃COONH₄ v poměru 2:8 a 6:4

Další možnosti mobilní fáze byly vyzkoušeny různé poměry methanolu, vody a acetonitrilu. Na obrázku č. 31 je ukázán rozdíl, při použití acetonitrilu a vody v různých poměrech, obrázek č. 32 ukazuje použití různých poměrů methanolu a vody.



Obrázek č. 31: Mobilní fáze ACN:H₂O v poměrech 60:40, 80:20 a 100:0



Obrázek č. 32: Mobilní fáze MeOH: H₂O v poměrech 60:40, 70:30 a 100:0

Jako nejvhodnější mobilní fáze byl zvolen čistý methanol. Chromatogram vykazoval nejlepší rozlišení píku, bez zbytečných deformací. Další poměry i vzájemné mísení ACN, MeOH a H₂O nebyly natolik efektivní, aby se vyrovnaly samotnému methanolu.

Průtok mobilní fáze byl optimalizován na 1 ml·min⁻¹, při nižších průtocích docházelo ke ztrátě ostroty píku a jeho rozmývání. Zvýšení teploty analýzy neovlivňovalo, kvalita ani intenzita signálu se neměnila, proto byla jako nejvhodnější teplota analýzy zvolena teplota za laboratorních podmínek

5.2 Optimalizace extrakce nikotinu z tabákového materiálu

V tabulce č. 2 jsou shrnuty výsledky zjištěné koncentrace nikotinu extrahovaného z klasických cigaret za různých podmínek. Postupy extrakce jsou uvedeny v kapitole 4.3. Jednotlivé vzorky byly po extrakci centrifugovány při 14 800 otáčkách po dobu 5 minut,

supernatant byl vhodně zředěn a použit ke stanovení nikotinu metodou HPLC/PDA. Hodnota vyextrahovaného nikotinu je uvedena v mg na jednu cigaretu.

Tabulka č. 2: Zjištěné koncentrace nikotinu různými metodami extrakce

způsob extrakce; pomocí:	koncentrace nikotinu [mg/cigaretu]
methanol, 15 min	3,31 ± 0,04
methanol, 15 min + ultrazvuk	3,44 ± 0,05
methanol, 30 min	3,38 ± 0,03
methanol, 30 min + ultrazvuk	3,96 ± 0,05
methanol, 60 min	6,85 ± 0,06
methanol, 60 min + ultrazvuk	7,96 ± 0,01
methanol, 12 hod	7,99 ± 0,02
methanol, 12 hod + ultrazvuk	8,51 ± 0,04
methanol, 24 hod	9,18 ± 0,04
methanol, 24 hod + ultrazvuk	9,62 ± 0,04
methanol, 36 hod	9,14 ± 0,06
methanol, 36 hod + ultrazvuk	9,50 ± 0,04
NaOH	2,74 ± 0,04
NaOH + ether (jednou vytřepané)	0,37 ± 0,03
NaOH + ether (tříkrát vytřepané)	0,84 ± 0,01
HCl	ND
HCl + ether	ND
H₂SO₄	3,2 ± 0,4

Při extrakci do methanolu byla s časem extrakce pozorována narůstající koncentrace izolovaného nikotinu. Působení ultrazvuku navíc výtěžek nikotinu ještě mírně zvýšil.

Po louhování v 5% hydroxidu sodném, následném zfiltrování a vhodném naředění methanolem byly zjištěny vyšší hodnoty, než při totožné metodě, ale s následným trojnásobným vytřepáním do etheru. Při samotném louhování byl stanoven obsah nikotinu na 2,74 mg v jedné cigaretě, naopak při metodě s vytřepáním do etheru pouze 0,84 mg nikotinu v jedné cigaretě. U metody s vytřepáním do etheru může být výsledek zatížen větší chybou při práci a ztrátami při delší manipulaci se vzorkem.

Po extrakci při kyselé hydrolýze pomocí kyseliny chlorovodíkové nedosahoval pík vhodné kvality a nebylo možné odečíst jeho plochu. Tato metoda extrakce byla tedy nevyhovující. Metodou extrakce pomocí kyseliny sírové byly naměřeny nižší hodnoty než u působení methanolem, a to 3,2 mg nikotinu na cigaretu.

Za nejvhodnější metodu byla tedy pro extrakci nikotinu z tabákových výrobků zvolena 24 hodinová extrakce v methanolu s následným podrobením ultrazvuku po dobu deseti sekund. Do této doby množství nikotinu s časem pořád mírně stoupalo, poté už zůstávala hodnota relativně stejná.

5.3 Optimalizace extrakce nikotinu v různých druzích výrobků a jeho stanovení

5.3.1 Stanovení nikotinu v náplních do elektronických cigaret

V předložené práci byl sledován obsah nikotinu v náplních do elektronických cigaret u celkem 18 druhů výrobků, přičemž 11 z nich bylo bez příchutě a 7 s příchutí. Tekuté náplně do elektronických cigaret bezpříchuťové nemusely být předem nijak upravovány, pouze patřičně zředěny methanolem. Náplně s příchutěmi byly nejdříve smíchány s 5% hydroxidem sodným v poměru 1:1 a až poté vhodně zředěny methanolem. Po zředění byly vzorky přímo nastříknuty na kolonu. Výsledky byly získány dosazením získaných hodnot do kalibrační křivky nikotinu (kapitola 5.1) a průměrné hodnoty ze tří paralelních měření jednotlivých náplní jsou uvedeny v tabulce č 3.

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty nikotinu v náplních do elektronických cigaret

výrobek	naměřený obsah nikotinu [mg·ml ⁻¹]	obsah nikotinu udaným výrobcem [mg·ml ⁻¹]
Desert Ship 0 mg	ND	0
Desert Ship 6 mg	5,4 ± 0,3	6
Desert Ship 11 mg	10,4 ± 1,2	11
Desert Ship 16 mg	16,9 ± 0,7	16
Desert Ship 18 mg	11,2 ± 0,5	18
Desert Ship 24 mg	24,1 ± 0,5	24
Daf 0 mg	ND	0
Daf 6 mg	6,5 ± 0,7	6
Daf 11 mg	9,6 ± 0,9	11
Daf 16 mg	15,7 ± 0,4	16
Daf 24 mg	23,9 ± 0,6	24
Banana 16 mg	14,0 ± 0,9	16
Straw-champ 16 mg	16,7 ± 0,6	16
Apple 16 mg	15,3 ± 0,3	16
Blueberry 16 mg	15,0 ± 0,7	16
Menthol 16 mg	15,4 ± 0,5	16
Water meloun 16 mg	16,3 ± 0,6	16
Crème caramel 16 mg	15,8 ± 0,2	16

U tabákových řad, s různými koncentracemi byly získány hodnoty nikotinu celkem blízké hodnotám uváděným na obalu výrobku. Pouze u výrobku Desert Ship 18 mg, se podařilo opakovaně změřit obsah nikotinu jen 11,2 mg. Ve výrobcích, kde měl být obsah nikotinu nulový, opravdu nebylo detekováno žádné množství nikotinu. U náplní s příchutěmi bylo nejdříve zvýšeno pH pomocí hydroxidu sodného, poté patřičně zředěny methanolem. Nejpresněji byl změřen vzorek Crème caramel, což je jediný výrobek zastoupený od značky Equites.

5.3.2 Stanovení nikotinu v nikotinových pastilkách

V předložené práci byl sledován obsah nikotinu v nikotinových pastilkách pouze u jednoho vybraného výrobku. Nikotinové pastilky byly pro analýzy připraveny dle kapitol 4.3.1 a 4.3.2. Získaná hodnota byla dosazena do kalibrační křivky nikotinu (kapitola 5.1) a pak přepočtena na jednu tobolku, která by měla dle výrobce obsahovat 4 mg nikotinu.

Tabulka č. 4: Zjištěné koncentrace nikotinu v pastilkách při různých metodách extrakce

použitá metoda	naměřená koncentrace nikotinu [mg]
extrakce MeOH 15 min	0,85 ± 0,02
extrakce MeOH 24 hod	0,88 ± 0,03
extrakce NaOH 15 min	1,01 ± 0,05
extrakce NaOH + do etheru	0,28 ± 0,02
extrakce NaOH 24 hod	2,49 ± 0,04
extrakce NaOH + ultrazvuk	2,19 ± 0,03
extrakce NaOH 36 hod	2,47 ± 0,03

Pro stanovení obsahu nikotinu v nikotinových pastilkách byla jako nejvhodnější postup zvolena extrakce v 5% roztoku hydroxidu sodného alespoň 24 hod, bez následného vytřepávání do etheru i bez působení ultrazvuku, který mohl působit mírně degradačně. Extrakcí methanolem se získaly velmi podobné hodnoty při působení 15 minut i 24 hodin, ale získané hodnoty byly nižší než při extrakci hydroxidem sodným, kdy se při 24 hodinovém působení extrahovalo a následně změřilo množství nikotinu 2,49 mg. I nejvyšší získaná hodnota se neblíží deklarovanému množství výrobcem, což bylo 4 mg.

5.3.3 Stanovení nikotinu v orodispergovatelném filmu

V předložené práci byl sledován obsah nikotinu v nikotinovém filmu u jednoho vybraného druhu výrobku. Nikotin z filmu byl extrahován pomocí postupů uvedených v kapitolách 4.3.1 a 4.3.2. Nikotin byl stanoven pomocí kapalinové chromatografie a naměřené hodnoty byly dosazeny do kalibrační rovnice nikotinu (kapitola 5.3). V tabulce č. 5 jsou uvedeny hodnoty ze tří paralelních měření, které byly získány jednotlivými metodami extrakce.

Tabulka č. 5: Zjištěné koncentrace nikotinu ve filmu při různých metodách extrakce

použitá metoda	naměřený obsah nikotinu [mg]
rozpuštění ve vodě	0,15 ± 0,01
rozpuštění v methanolu	0,98 ± 0,03
rozpuštění v methanolu + ultrazvuk	1,02 ± 0,02
rozpuštění v NaOH + ether	0,65 ± 0,03
rozpuštění v NaOH 24 hod	1,67 ± 0,03
rozpuštění v NaOH + ultrazvuk	1,45 ± 0,02

V žádném z postupů se nepodařilo vyizolovat a změřit takové množství, jako uvádí výrobce. Deklarovaná hodnota pro tento produkt je obsah 2,5 mg nikotinu v jednom filmu. Největší množství se podařilo získat v postupu, kdy byl plátek extrahován hydroxidem sodným, a to 1,67 mg nikotinu.

5.3.4 Stanovení nikotinu v nikotinových žvýkačkách

V práci byl sledován obsah nikotinu ve žvýkačkách u dvou vybraných výrobků. Pro analýzu byly žvýkačky připraveny několika způsoby. Postupy pro extrakce jsou uvedeny v kapitolách 4.3.1 a 4.3.2. Naměřená hodnota nikotinu stanovená metodou HPLC/PDA byla dosazena do kalibrační křivky nikotinu (kapitola 5. 1). Tabulka č. 6 ukazuje srovnání naměřeného nikotinu pro různé metody extrakce pro mentholové žvýkačky, u kterých byla výrobcem deklarována koncentrace nikotinu 4 mg na jednu žvýkačku.

Tabulka č. 6: Zjištěné koncentrace nikotinu ve žvýkačce při různých metodách extrakce

použitá metoda	naměřený obsah nikotinu [mg]
extrakce MeOH 15 min	1,0 ± 0,3
extrakce MeOH 24 hod	1,12 ± 0,02
extrakce NaOH 15 min	1,22 ± 0,04
extrakce NaOH + do etheru	0,76 ± 0,07
extrakce NaOH 12 hod	1,64 ± 0,03
extrakce NaOH 24 hod	3,98 ± 0,02
extrakce NaOH + ultrazvuk	3,01 ± 0,03
extrakce NaOH 36 hod	3,97 ± 0,03

Účinek působení ultrazvuku po dobu deseti vteřin je v případě extrakce ze žvýkačkových výrobků, na rozdíl od tabákových výrobků, nevhodný. Obsah nikotinu se zde působením ultrazvuku snížil.

Jako nejúčinnější způsob extrakce nikotinu ze žvýkačky byla, stanovená metoda extrakce využitím hydroxidu, kde bylo minimálně po 24 hodinové louhování v 5% hydroxidu sodném stanoveno množství 3,98 mg nikotinu na žvýkačku. Zjištěná hodnota je velice přesná a dá se srovnat s deklarovanou, která je 4 mg. Touto metodou byl extrahován a stanoven nikotin i u druhého testovaného výrobku.

Tabulka č. 7: Naměřené hodnoty nikotinu ve žvýkačkách Nicorette

nikotinové žvýkačky	naměřený obsah nikotinu [mg/žvýkačku]	obsah nikotinu udaným výrobcem [mg/žvýkačku]
Nicorette mentholové	3,98 ± 0,03	4
Nicorette fresh fruit	1,99 ± 0,04	2

Optimalizovanou metodou bylo u obou žvýkaček stanoveno deklarované množství nikotinu.

Pro zjištění reálně uvolněného nikotinu do těla z jedné žvýkačky bylo stejnou metodou analyzováno i množství nikotinu ve vyžvýkaných žvýkačkách. Vyžvýkání provedli dobrovolníci podle návodu uvedeného v příbalovém letáku v balení. Ve vyžvýkaných žvýkačkách Nicorette mentholové 4 mg byl zbytkový obsah nikotinu 2,75 mg a ve vyžvýkaných žvýkačkách Nicorette fresh fruit byl zbytkový obsah nikotinu stanoven na 1,54 mg. Zbytkový obsah nikotinu je poměrně vysoký, u 4 mg žvýkaček 68 % a u 2 mg žvýkaček dokonce 77 %. Rozdíly mohou být způsobeny tím, že každou žvýkačku žvýkal jiný dobrovolník a tudíž žvýkali s jinou intenzitou.

5.3.5 Stanovení nikotinu v nikotinovém spreji

V předložené práci byl sledován obsah nikotinu ve spreji pouze u jednoho, vybraného výrobků. Ze spreje bylo třikrát špláchnuto, (obsah této dávky byl změřen na 420 µl) a k tomu bylo přidáno 10 ml methanolu. Toto množství se uvádí jako jedna dávka. Směs byla deset sekund podrobena účinku ultrazvuku a vzorek byl přímo nastříknut na kolonu. Takto byl zjištěn v jedné dávce spreje obsah nikotinu 0,28 mg. Dle údajů výrobce obsahuje balení cca 100 stříknutí. Obsah nikotinu v celém balení byl stanoven na 10,05 mg., což je menší než množství uvedeno výrobcem 11 - 13,5 mg v celém balení 15 ml.

5.3.6 Stanovení nikotinu ve šňupacím tabáku

V práci byl sledován obsah nikotinu ve šňupacím tabáku u dvou vybraných výrobků. Nikotin ze šňupacího tabáku byl extrahován pomocí methanolu dle návodu v kapitole 4.3.1. Extrakce nikotinu probíhala 24 hodin, protože tato metoda extrakce byla v rámci optimalizace extrakce nikotinu z tabákového materiálu vyhodnocena jako nejvhodnější.

Přesná navážka šňupacího tabáku byla tedy extrahována do methanolu, roztok byl vhodně naředěn a pomocí kapalinové chromatografie byl poté analyzován obsahu nikotinu v jednotlivých vzorcích. Výsledná hodnota, byla přepočtena na celé balení, které u obou testovaných vzorků činilo 10 g.

Tabulka č. 8: Naměřené hodnoty nikotinu u šňupacího tabáku

Výrobek šňupacího tabáku	naměřený obsah nikotinu [mg/10g]
tabák Gletscher Prise Snuff	66,0 ± 0,4
tabák Red Bull Strong Snuff	103,6 ± 0,7

5.3.7 Stanovení nikotinu v klasických cigaretách

V této práci byl sledován obsah nikotinu celkem u deseti druhů cigaret. Nikotin byl z klasických cigaret extrahován pomocí methanolu dle návodu v kapitole 4.3.1. Extrakce probíhala 24 hodin, protože tato metoda extrakce byla v rámci optimalizace extrakce nikotinu z tabákového materiálu vyhodnocena jako nejvhodnější.

Žádný výrobce bohužel neuvádí, kolik nikotinu obsahují cigarety v nezapáleném stavu, ale pouze údaj s předpokládaným množstvím uvolněného do těla z jedné vykouřené cigarety. V tabulce č. 9 jsou uvedeny hodnoty stanovené koncentrace nikotinu v jednotlivých výrobcích měřené metodou HPLC/PDA.

Tabulka č. 9: Naměřené hodnoty nikotinu u různých druhů cigaret

druh cigarety	zjištěný obsah nikotinu [mg]	údaj výrobce o množství využitelného nikotinu [mg/cigaretu]
Marlboro red	13,9 ± 0,4	0,8
Winston classic	10,4 ± 0,3	0,8
Phillip Morris Ruby	9,5 ± 0,1	0,8
Sparta classic	8,4 ± 0,3	0,7
Start by Chesterfield	8,6 ± 0,1	0,7
Camel activate double	7,9 ± 0,2	0,6
LM loft blue	9,3 ± 0,4	0,6
Marlboro gold	9,0 ± 0,5	0,6
Davidoff shape	8,1 ± 0,1	0,6
Kiss superslims strawberry	7,5 ± 0,1	0,5

V silnějších cigaretách, kdy výrobce uvádí vyšší deklarovanou hodnotu množství uvolněného nikotinu z jedné cigarety, byl zjištěn i vyšší obsah nikotinu. S klesající silou cigaret, klesalo i vyizolované a následně zjištěné množství nikotinu. U Marlboro gold a LM loft blue byl obsah vyšší než u stejně silných cigaret, ale zároveň byla největší i směrodatná odchylka u měření. U Marlboro red byl obsah nikotinu naměřen podstatně vyšší než u stejně silných cigaret, naměřeno taktéž s vyšší směrodatnou odchylkou.

5.4 Návrh vlastního produktu s nikotinem

Jako vlastní nikotinový produkt byly navrženy malé gelové kapsle s enkapsulovaným nikotinem, které by se potenciálně spolkly, či rozžvýkali. Částice s nikotinem byly připraveny pomocí manuální enkapsulace, kdy byl polysacharidový roztok přikapáván do srážecího roztoku pipetou. Pro porovnání a možnost velkokapacitní výroby byly částice také připraveny na enkapsulátoru B - 395 Pro. Přesné postupy přípravy jednotlivých částic jsou uvedeny v kapitole 4.4.

5.4.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

V této práci byly tedy testovány 2% chitosanové, 2% alginátové a 2% alginát-škrobové částice. Enkapsulační účinnost nikotinu byla stanovena za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie, kde bylo z rozdílu koncentrace nikotinu před a po enkapsulaci stanoveno jeho enkapsulované množství v jednotlivých částicích.

Alginátové částice připravené manuálně i za pomoci enkapsulátoru vykazovaly srovnatelnou hodnotu enkapsulační účinnosti, která se pohybovala okolo 96 %.

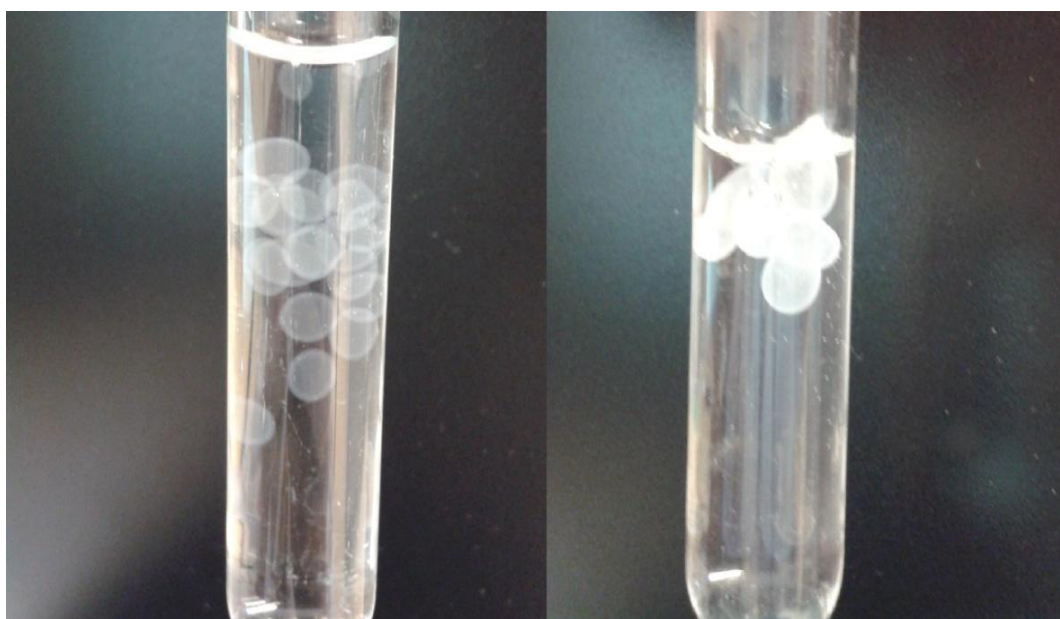
Nejvyšší enkapsulační účinnosti bylo ovšem dosaženo u alginát-škrobových částic, u kterých byla enkapsulační účinnost stanovena na téměř 99 %.

U chitosanových částic byla enkapsulační účinnost stanovena o 10 % nižší, než tomu bylo u alginátových částic. V tabulce č. 10 jsou přehledně srovnány hodnoty účinnosti u všech tří typů částic.

Tabulka č. 10: Enkapsulační účinnost připravených částic

částice	enkapsulační účinnost [%]
chitosanové	88,74
alginátové	95,79
alginát-škrobové	98,71

Alginátové a alginát-škrobové částice vyhovovali nejen díky své vyšší enkapsulační účinnosti, ale také z hlediska jejich mechanické stability. Naopak chitosanové částice neměly dostatečnou mechanickou pevnost a ani po dlouhodobém vytvrzení v srážecím roztoku nedosahovaly pevnosti zbylých dvou typů částic. Z tohoto důvodu a také s přihlédnutím na vyšší cenu chitosanu ve srovnání s alginátem byly chitosanové částice z dalších testů vyloučeny. Na obrázku č. 27 jsou pro srovnání vyobrazeny částice alginátové a chitosanové.



Obrázek č. 27: Připravené alginátové (vlevo) a chitosanové (vpravo) částice

5.4.2 Stabilita v trávicích šťávách

Vyhovující alginátové a alginát-škrobové částice byly dále podrobeny testování stability v trávicích šťávách. Pro reálnou simulaci užití těchto částic, byly podrobeny účinkům uměle připravených trávicích šťáv. Příprava šťáv a postup trávení je uvedena v kapitole 4.4.6.

Obsah nikotinu uvolněný působením trávicích šťáv byl analyzován metodou HPLC, z kalibrační křivky nikotinu bylo vypočteno množství uvolněného nikotinu. Porovnáním s množství nikotinu v částicích bylo dále dopočítáno množství uvolněného nikotinu z částic a v procentech uvedeno v následujících tabulkách.

Tabulka č. 11 ukazuje procento uvolněného nikotinu, při působení jednotlivých trávicích šťáv samostatně. Tabulka č. 12 ukazuje procento uvolněného nikotinu z jednotlivých vzorků při působení trávicích šťáv postupně jdoucích za sebou pro reálnější přiblížení samotného trávení. Tomuto testování byly dále podrobeny jak čerstvě připravené částice, tak částice po třítydenním uchovávání v modelových prostředích.

Tabulka č. 11: Množství uvolněného nikotinu v jednotlivých trávicích šťávách

částice	procento uvolněného nikotinu [%]		
	v žaludeční	v pankreatické	ve žlučové
alginátové	0,23	0,64	0,78
alginát-škrobové	3,20	1,84	0,86

Při testování stability alginátových částic v jednotlivých trávicích šťávách nebylo detekováno významné množství uvolněného nikotinu ve všech typech šťáv. U alginát-škrobových částic došlo k drobnému uvolnění nikotinu v případě pankreatické a žaludeční šťávy, kdy bylo dosaženo nejvyššího množství uvolnění nikotinu 3,2%.

Tabulka č. 12: Množství uvolněného nikotinu v trávicích šťávách za sebou

částice		uvolněný nikotin [%]			
		v žaludeční	v pankreatické	ve žlučové	celkem
alginát-škrobové čerstvé	celé	3,1	1,4	0,4	4,9
	rozbité	2,7	0,8	0,5	4,0
alginát-škrobové 3 týdenní (v EtOH)	celé	9,6	11,3	1,6	22,5
	rozbité	5,5	1,4	0,8	7,7
alginát-škrobové 3 týdenní (v H₂O)	celé	6,4	2,3	0,8	9,5
	rozbité	0,7	0,2	0,1	1,0
alginátové 3 týdenní (v EtOH)	celé	0,8	2,2	3,4	6,4
	rozbité	0,8	1,5	0,9	3,2
alginátové 3 týdenní (v H₂O)	celé	3,3	2,1	1,8	7,2
	rozbité	5,5	2,0	1,7	9,2

Při testování stability částic působením trávicích šťáv postupně jdoucích za sebou, bylo největšího uvolnění nikotinu zjištěno u částic alginát-škrobových uchovávaných v 10% ethanolu, a to 22,5 %. U stejných částic uchovávaných ve vodě bylo zjištěné celkové uvolnění 9,5 %, což bylo obdobné jako u částic alginátových uchovávaných ve vodě. Nejmenší uvolnění nikotinu bylo zjištěno u alginátových částic uchovávaných v 10% ethanolu. U čerstvých alginát-škrobových částic bylo detekováno obdobné množství uvolnění nikotinu jako v případě, kdy byla testována stabilita v jednotlivých trávicích šťávách

Při stanovení stability byly použity částice vcelku, ale i rozdrčené částice. Tímto byly simulovány možnosti užívání přípravku a to spolknutí nebo rozkousání nikotinové kapsle. Porovnáním hodnot uvolněného nikotinu u obou metod lze říci, že rozdrčení částice nemělo významný vliv na množství uvolněného nikotinu, naopak u této metody došlo k nižšímu uvolnění nikotinu než v případě ponechání celých částic, pouze u alginátových kapslí, které byly uchovávány ve vodě, byl zjištěn vliv rozbití částic. V reálné situaci by mohlo být uvolnění nikotinu ještě vyšší. Zejména v ohledu na delší dobu trávení, či vstřebávání v ústech. Simulace uměle připravených slin zde nebyla zkoušena.

5.4.3 Stabilita částic v některých z modelových prostředí potravin

Vytvořené částice byly ponechány při laboratorní teplotě ve dvou modelových prostředích, destilované vodě a v 10% roztoku ethanolu. V daných časových intervalech bylo sledováno uvolněné množství nikotinu. Jako modelové prostředí byly vybrány pouze voda a ethanolový roztok z důvodu vhodného prostředí pro předpokládané skladování výrobku.

Výsledný přehled uvolněného množství nikotinu v jednotlivých časech je shrnutý v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Množství uvolněného nikotinu při zjišťování stability v modelových prostředích

částice	prostředí	procento uvolněného nikotinu [%]			
		t = 0	t = 1. týden	t = 2. týden	t = 3. týden
alginátové	vodné	0,50	0,54	0,76	0,98
	ethanolové	0,61	0,61	0,64	1,10
alginát-škrobové	vodné	0,38	1,10	1,11	1,10
	ethanolové	0,67	1,11	1,11	1,12

Částice v modelových prostředích vykazují dobrou stabilitu. Z alginátových i alginát-škrobových částic se po třech týdnech uvolnilo pouze 1,1 % enkapsulovaného nikotinu. Je zde patrný drobný rozdíl ve vodném a ethanolovém prostředí, kdy se nikotin pomaleji uvolňuje právě ve vodném prostředí.

5.4.4 Zhodnocení vlastního produktu

Vytvořené částice by pro uživatele mohly být zajímavé, jak svým vzhledem, chutí ale i jednoduchostí užívání. Konzistencí jsou to měkké gelové kuličky, připomínající želatinové bonbony, v průměru asi 5 mm, v ústech by se mohly buď rozkousat, chvíli cumlat nebo rovnou spolknout, tak jak by měl spotřebitel zrovna chuť.

Jako nejvhodnější materiál pro výrobu nikotinových kapslí byla stanovena kombinace alginátu a škrobu. Alginát-škrobové částice vykazovaly nejvyšší enkapsulační účinnost, která dosahovala 98,7 %. Tyto částice měly také dobrou pevnost a vyhovovaly tak i z hlediska mechanických vlastností. Při jejich natrávení modelovými trávicími šťávami u nich bylo rovněž uvolněno nejvyšší množství nikotinu.

Pro uchovávání připravených částic bylo jako vhodnější prostředí stanoveno ethanolové prostředí pro alginát-škrobové částice. Vodné prostředí vykazovalo také velmi dobré výsledky pro dlouhodobé uchovávání produktu. Z částic uchovávaných ve vodném prostředí, se po následném trávení lépe uvolňoval nikotin z alginátových částic.

Na obrázku č. 28 jsou zobrazeny připravené alginát-škrobové kapsle s enkapsulovaným nikotinem o koncentraci 0,1 mg na jednu částici.



Obrázek č. 28: Alginát-škrobové částice jako vlastní nikotinový produkt

V budoucích pokusech by jistě bylo zajímavé jich podrobit různým vylepšením, jako například přidání barviva a aroma pro lepší organoleptické vlastnosti výrobku. Nebo například zakomponováním dalších přídatných látek, vitamínů, minerálů.



Obrázek č. 29: Alginát-škrobové částice jako vlastní nikotinový produkt s možnou ovocnou příchutí.

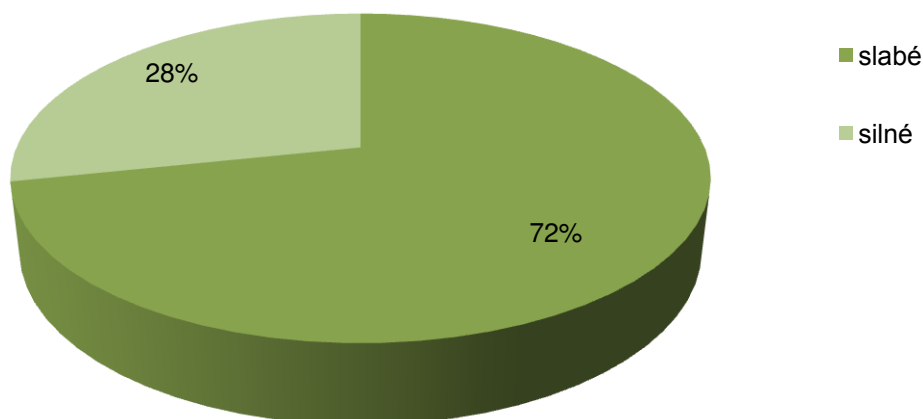
Dalším důležitým krokem pro úspěšný vstup výrobku na trh by bylo navržení vhodného obalu nebo dávkovače, pro snadnou manipulaci s výrobkem a jednoduché dávkování pro spotřebitele. Kapsle by mohly být dávkovány v malých sáčkích buď na jednorázové otevření, nebo opětovné zavření. Výrobce by byla určena maximální denní dávka a záleželo by jen na spotřebiteli, jestli by si ji vybral najednou, nebo postupně během dne. Pokud by se dávkování řídilo dle získaných výsledků, mohlo by být dávkování navrženo tak, že z vyrobených produktů o koncentraci 1 mg nikotinu na částici, kdy se v něm vstřebá 20 %, se do těla uvolní 0,2 mg nikotinu. Jednorázová dávka pro lehčího kuřáka by mohla činit 10 částic, pro těžšího kuřáka 20 částic.

5.5 Spotřebitelský dotazník

5.5.1 Odpovědi kuřáků

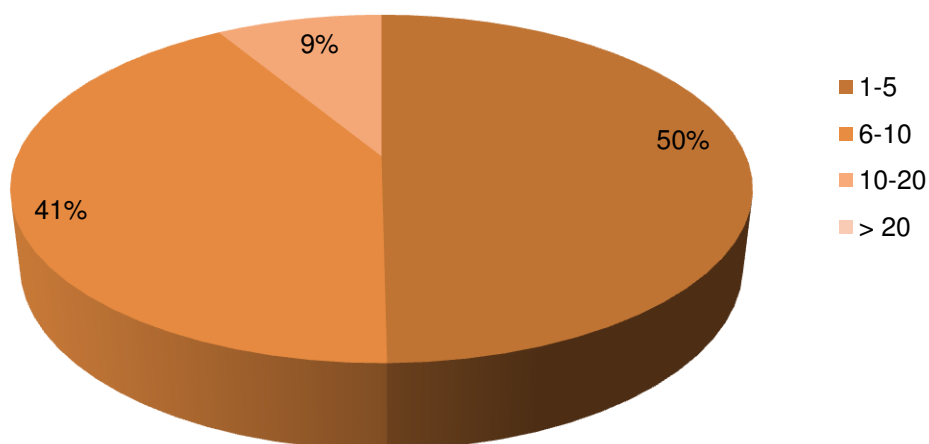
V následujícím přehledu jsou graficky vyobrazeny odpovědi kuřáků. Přesné znění dotazníku je uvedeno v příloze č. 2. Odpovědělo 88 respondentů, z nichž bylo 90 % ve věkovém rozmezí 18 - 30 let, 5 % bylo mladších 18 let a 5 % starší třiceti let.

Jaké cigarety kouříte?



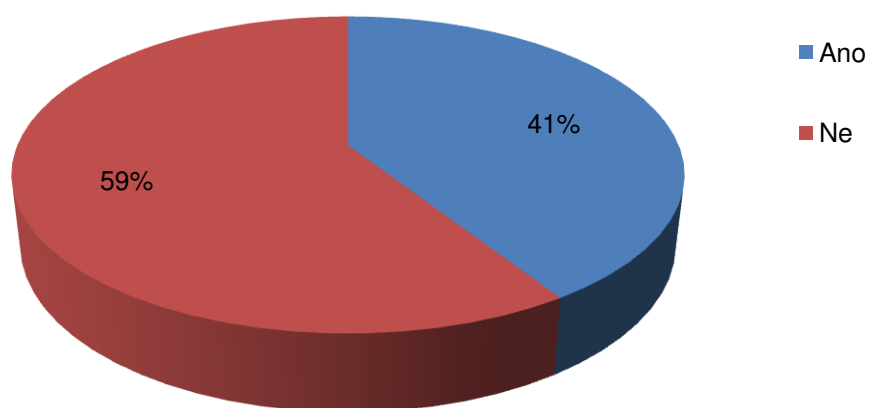
Graf č. 1: kuřáci, otázka č. 3

Kolik cigaret vykouříte za den?



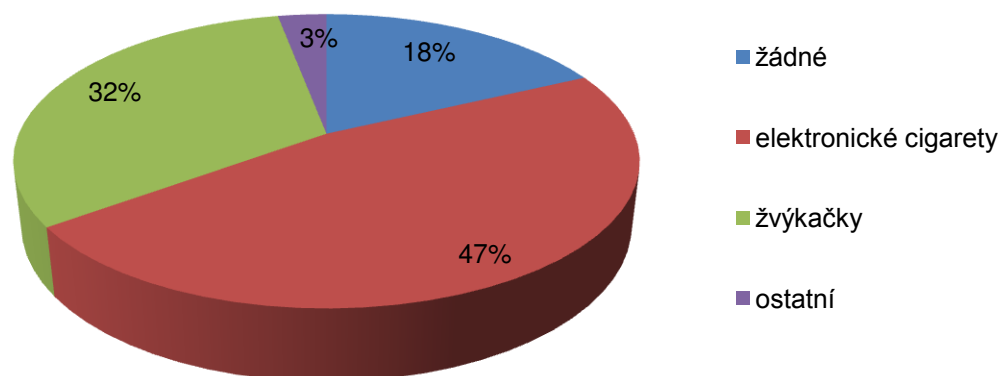
Graf č. 2: kuřáci, otázka č. 4

Vyzkoušeli jste někdy příjem nikotinu jinak než v klasické cigaretě?



Graf č. 3: kuřáci, otázka č. 5

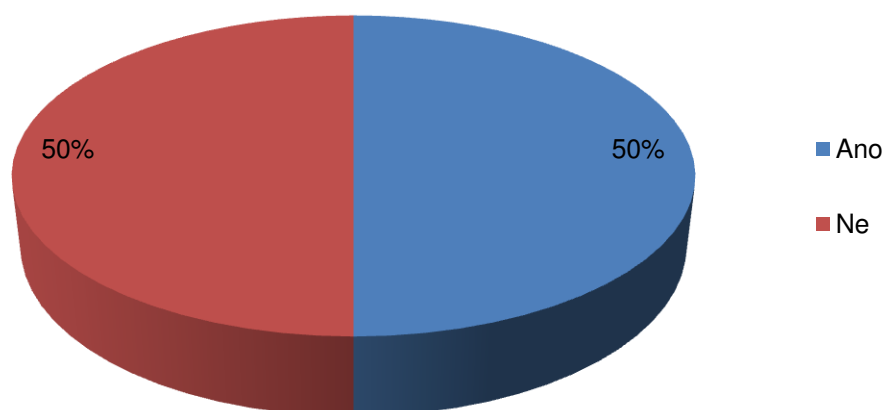
Na jaké jiné zdroje nikotinu než v klasické cigaretě si vzpomenete?



Graf č. 4: kuřáci, otázka č. 6

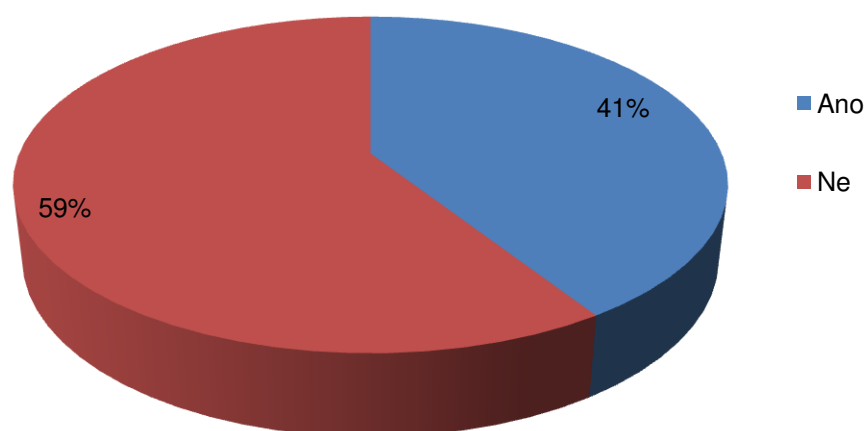
V odpovědích ostatní se objevil šňupací tabák, nikotinové náplasti, nikotinový sprej, žvýkací tabák, vodní dýmka, nikotinové bonbóny a doutník.

Znáte koncentraci nikotinu ve výrobcích které užíváte?



Graf č. 5: kuřáci, otázka č. 7

Myslíte si, že jsou elektronické cigarety zdravější než normální?

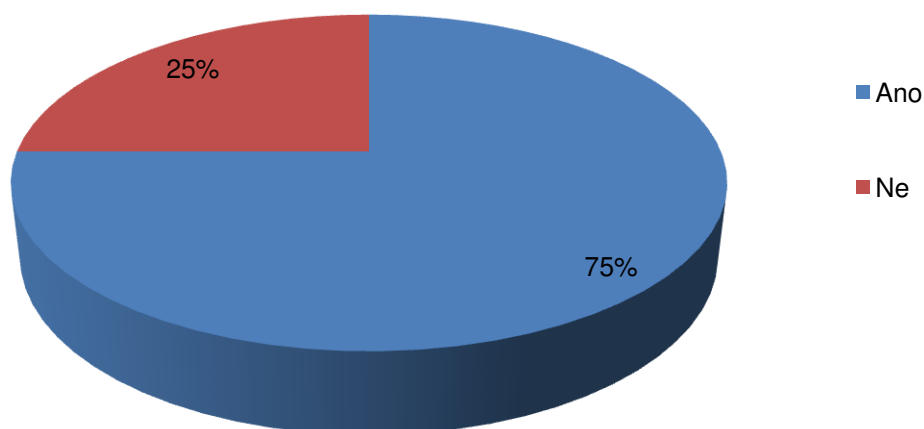


Graf č. 6: kuřáci, otázka č. 8

Znáte smrtelnou dávku nikotinu? Jaká to je?

Na otázku č. 9, zdali kuřáci znají smrtelnou dávku nikotinu, neodpověděl ani jeden respondent dobře. Pouze jedna odpověď byla blízko skutečnosti, ale byla napsána společně s otazníkem, tudíž se dá předpokládat, že to byl respondentův pouhý odhad. Většina odpovídajících napsala přímo „ne“ nebo „nevím“, ostatní hádali, protože své odpovědi doplnili otazníkem. Někdo napsal i odpověď, že nevěděl, že nikotin může být smrtelný.

Myslíte si, že má nikotin i nějaké pozitivní účinky?

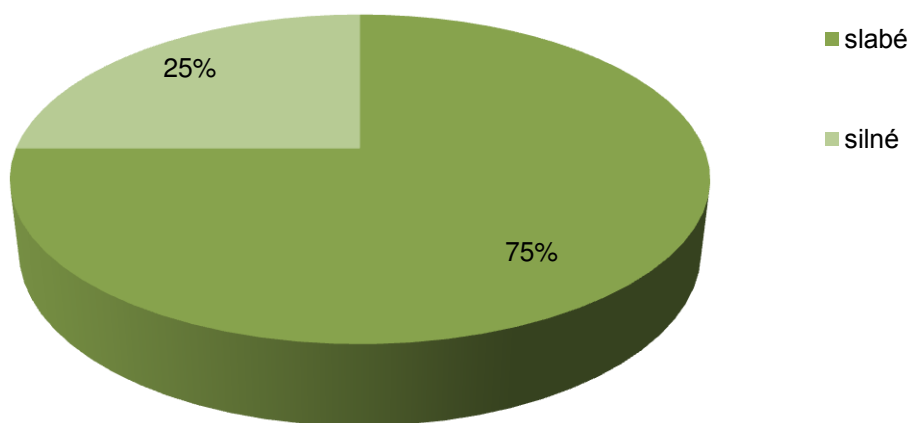


Graf č. 7: kuřáci; otázka č. 10

5.5.2 Odpovědi bývalých kuřáků

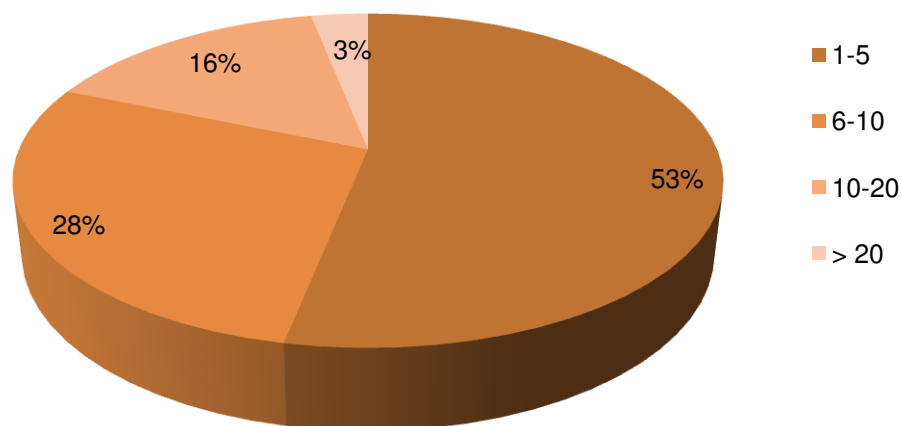
V následujícím přehledu jsou vyobrazeny odpovědi bývalých kuřáků. Přesné znění dotazníku je uvedeno v příloze č. 3. Zde odpovídalo 80 respondentů, zajímavé je že v této kategorii se vyskytovaly pouze ženy. V průzkumu se nenašel žádný muž, který s kouřením přestal. 2,5 % bylo osob mladších 18 let, 20 % starší 30 let, zbytek, tudíž 77,5 % bylo ve věkové kategorii 18 - 30 let.

Jaké cigarety jste kouřili?



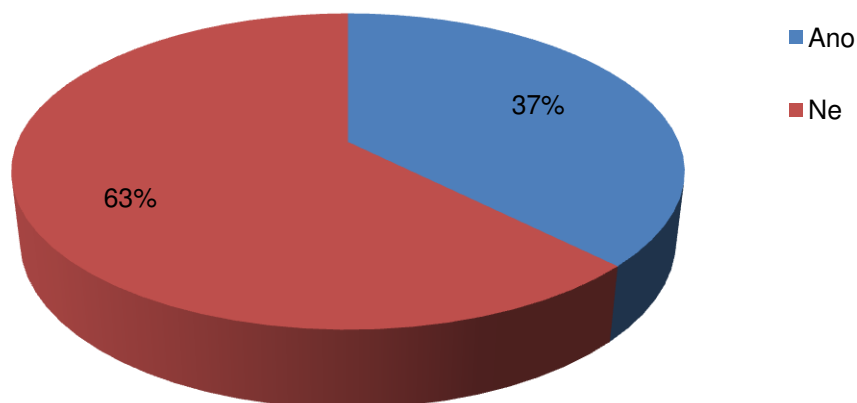
Graf č. 8: bývalí kuřáci, otázka č. 3

Kolik cigaret jste vykouřili za den?



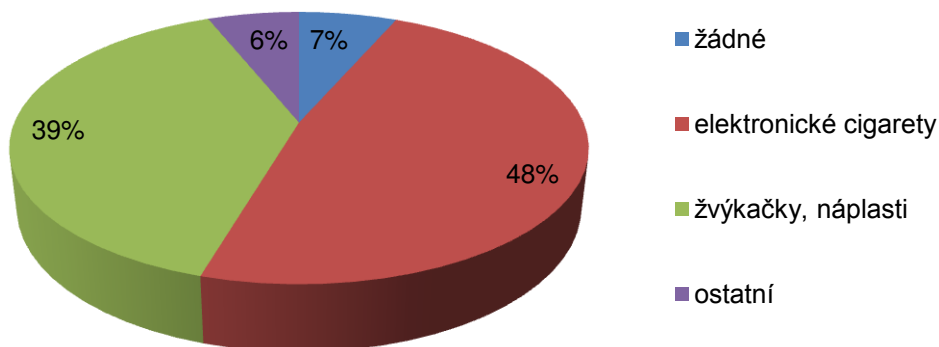
Graf č. 9: bývalí kuřáci, otázka č. 4

Vyzkoušeli jste někdy příjem nikotinu jinak než v klasické cigaretě?



Graf č. 10: bývalí kuřáci, otázka č. 5

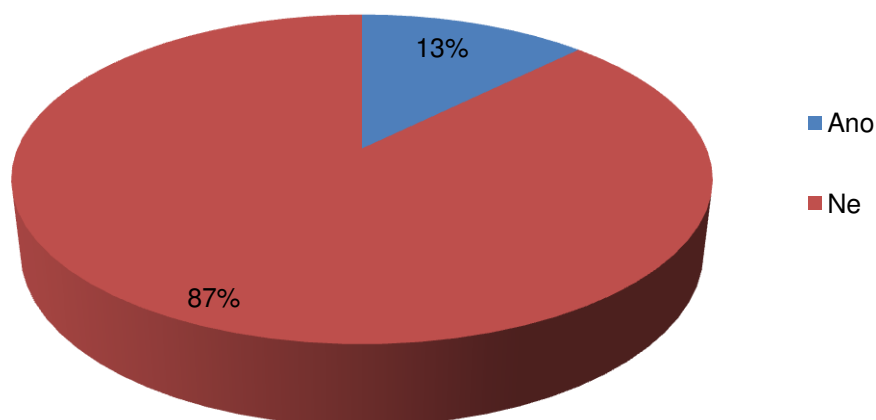
Na jaké jiné zdroje nikotinu než v klasické cigaretě si vzpomenete?



Graf č. 11: bývalí kuřáci, otázka č. 6

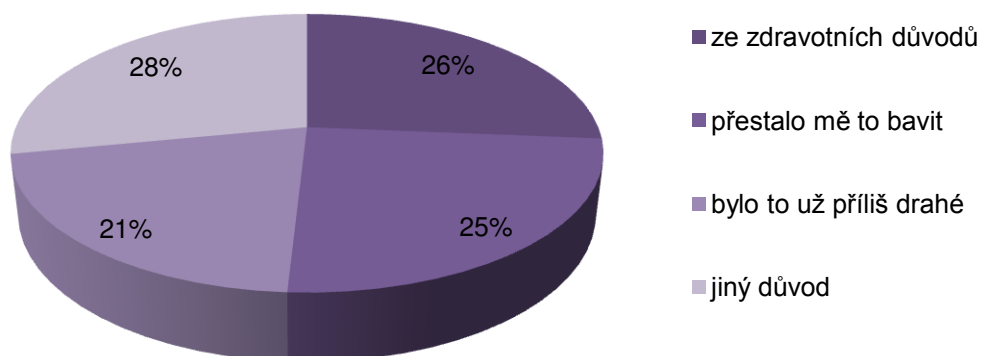
Další odpovědi, označené jako ostatní, byly vzácné, například šňupací tabák, sprej, doutník, ale objevily se i odpovědi jako léky, inhalátor a lízátko.

Pomohli vám některé tyto výrobky přestat kouřit?



Graf č. 12: bývalí kuřáci, otázka č. 7

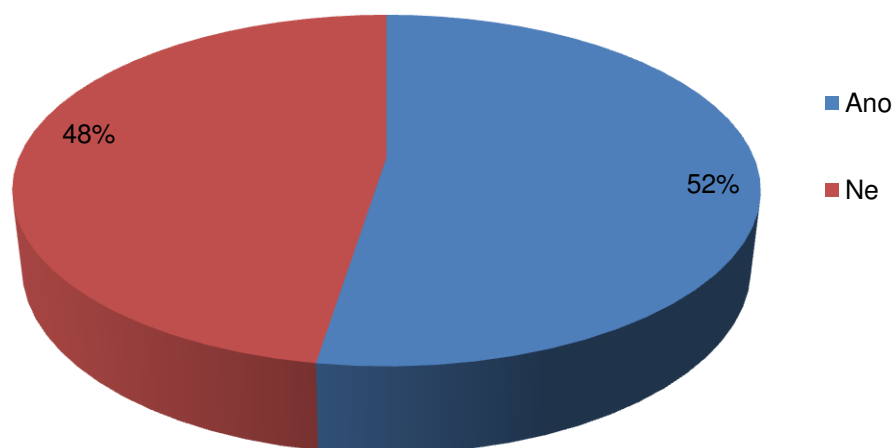
Proč jste přestali kouřit?



Graf č. 13: bývalí kuřáci, otázka č. 8

Otázka č. 8 byla otevřená a odpovědi mohlo být označeno více. Jako jiné důvody byly uvedeny nejvíce těhotenství, dále úmrtí v rodině na rakovinu. Další zmínky byly proto, že jen chtěli kvůli sobě, nechtěli se soustředit na chuť na cigaretu nebo kvůli partneru nekuřákovi.

Myslíte si, že jsou elektronické cigarety zdravější než normální?



Graf č. 14: bývalí kuřáci, otázka č. 9

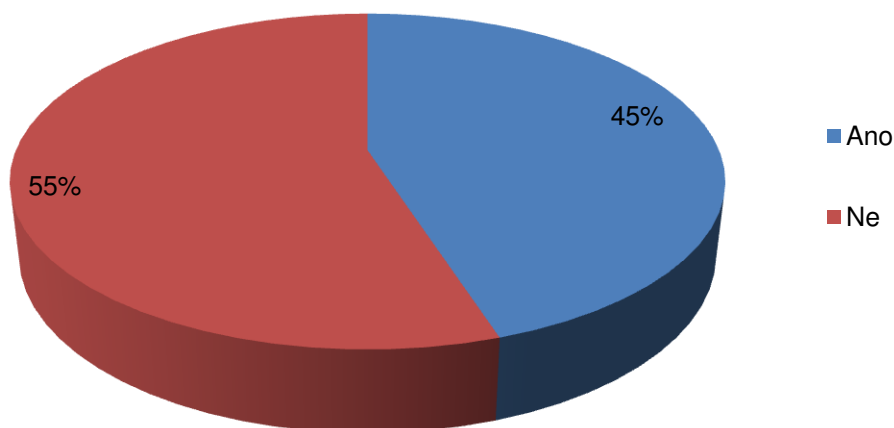
Ocenili byste i jinou alternativu příjmu nikotinu na trhu? Jakou byste navrhli?

Otázka č. 10 byla zaměřena na průzkum spotřebitelů, jestli by ocenili na trhu ještě jiný příjem nikotinu, než dosud existující formy. Pouze jeden respondent napsal něco jako čajový pytlík s nikotinem, který by se vylouhoval a následně se vzniklý nápoj vypil. Všichni ostatní by nic nového a v podstatě ani stávajícího neocenili, myslí si, že přijímat nikotin v nějaké jiné formě je naprosto zbytečné, protože kuřák si užívá hlavně rituál samotného kouření, vše je jen o psychice. Jedna odpověď zněla, že lepší než jakákoliv náhražka je kvalitní osvěta.

Znáte smrtelnou dávku nikotinu? Jaká to je?

V otázce č. 11 respondenti odpovídali na dotaz, jestli znají smrtelnou dávku nikotinu. Pouze 2,5 % odpovídajících ji vědělo, jinak napsali přímé odpovědi „neznám“, „nevím“ nebo číslo pouze hádali, protože ho doplnily otazníkem.

Myslíte si, že má nikotin i nějaké pozitivní účinky?

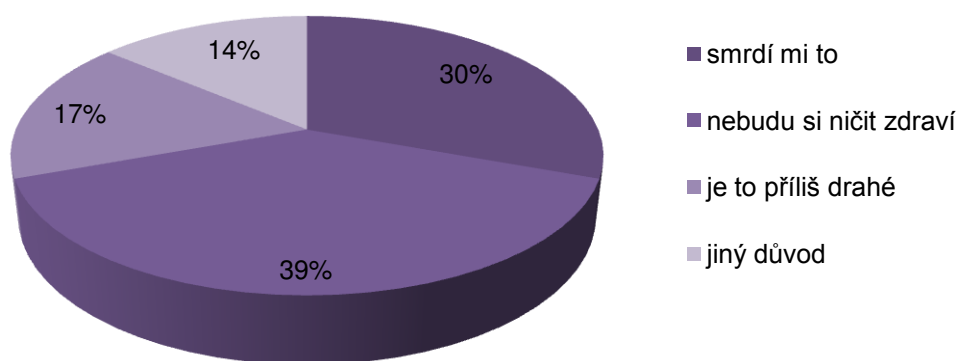


Graf č. 15: bývalí kuřáci, otázka č. 12

5.5.3 Odpovědi nekuřáků

V následujícím přehledu jsou vyobrazeny odpovědi nekuřáků. Přesné znění dotazníku je uvedeno v příloze č. 4. Odpovídalo 74 nekuřáků. 92 % odpovídajících na tento průzkum byly ženy, muži tvořili pouze 8 %. 91 % respondentů patřilo do věkové skupiny 18 - 30 let, zbytek byly osoby mladší 18 let.

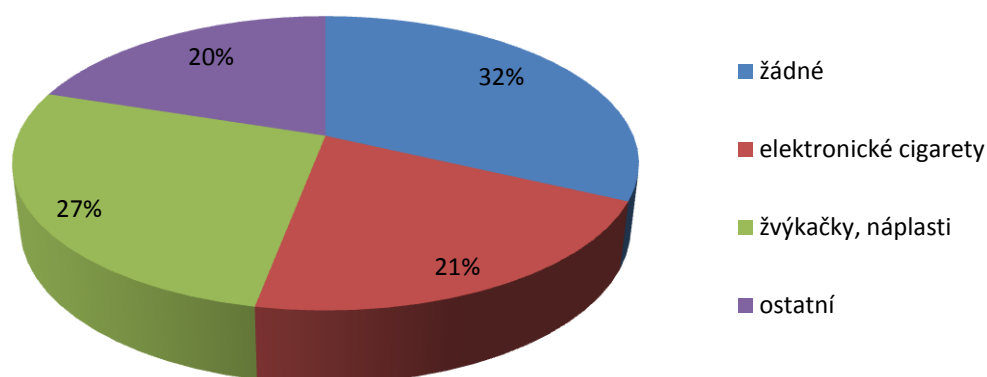
Proč nekouříte?



Graf č. 16: nekuřáci, otázka č. 3

Otázka č. 3 byla otevřená a odpovědi mohlo být označeno více. Nekuřáci uvádějí jako jiné důvody fakt, že je to prostě ani neláká, nemají zapotřebí začínat a připadá jim to naprosto zbytečné. Nejčastějším důvodem je fakt, že si nechtějí ničit zdraví, poté že jim to smrdí. Finanční stránka ovlivňuje jen 17 % dotázaných.

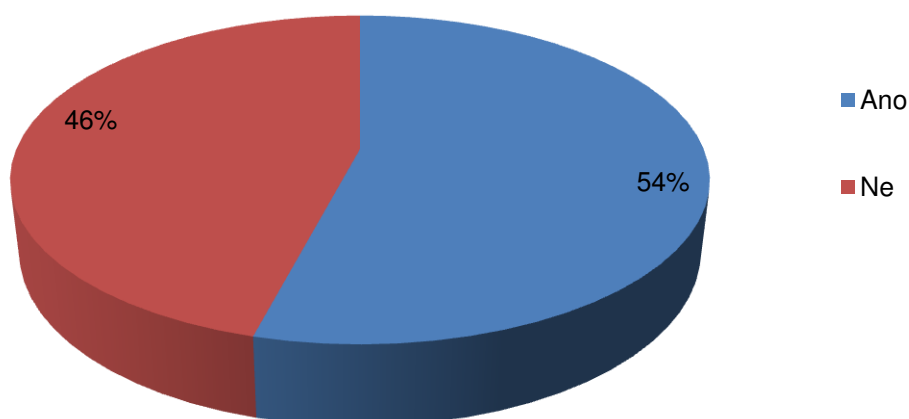
Na jaké jiné zdroje nikotinu než v klasické cigaretě si vzpomenete?



Graf č. 17: nekuřáci, otázka č. 4

Mezi odpovědi ostatní byly například vodní dýmka, doutník, nikotinová náplast, žvýkací tabák, ale objevily se i odpovědi jako káva a „energy drink“ – energetický nápoj..

Myslíte si, že jsou elektronické cigarety zdravější než normální?

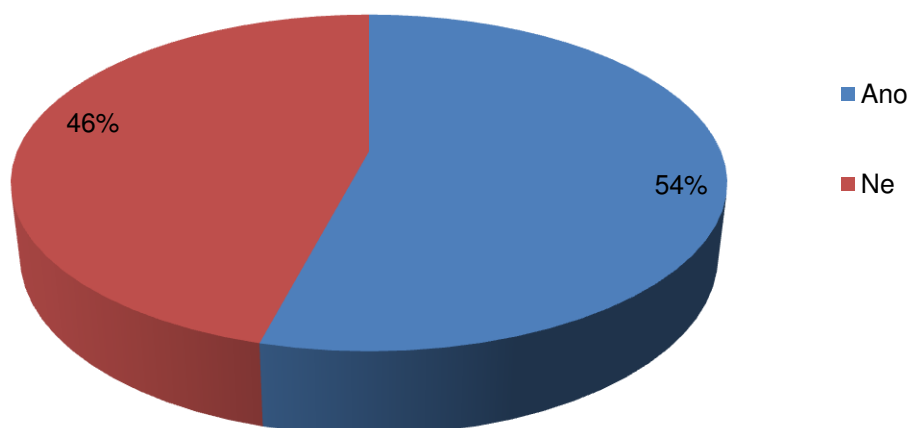


Graf č. 18: nekuřáci, otázka č. 5

Znáte smrtelnou dávku nikotinu? Jaká to je?

Smrtelnou dávku nikotinu zná pouze 5 % dotázaných. Ostatní napsali, že nemají vůbec žádnou představu, někteří odpovědi jen tipovali, protože ji doplnili otazníkem.

Myslíte si, že má nikotin i nějaké pozitivní účinky?



Graf č. 19: nekuřáci, otázka č. 7

5.5.4 Zhodnocení průzkumu

Pouze 28 % kuřáků a 25 % bývalých kuřáků kouří těžší cigarety, to znamená s větším podílem nikotinu. U kuřáků, kteří kouří lehčí cigarety, se dá předpokládat, že je pro ně fyzicky jednodušší přestat, ovšem psychická závislost bývá většinou horší. Mezi bývalými kuřáky byli kuřáci, kteří kouřili větší počet cigaret za den než kuřáci, kteří kouří stále. Co se týče znalosti koncentrace nikotinu, kterou kuřáci užívají, je hodnocení mizivé, pouze 50 % lidí ví, co dostávají do těla. 37 % bývalých kuřáků vyzkoušelo alternativní příjem nikotinu, ale pouze 13 % z nich tyto výrobky pomohly přestat kouřit. Dá se tedy říct, že při odvykání kouření je hlavně důležitá psychika a vnitřní odhodlání člověka s kouřením přestat. Důvody pro přestání kouřit byly víceméně vyrovnané, zdravotní důvody, omrzelost i finance.

Kdo si nejvíce myslí, že nikotin má i pozitivní účinky, jsou kuřáci, myslí si jich to 75 %, naopak bývalých kuřáků si to myslí jen 45 %. Nekuřáků si to myslí o trochu více, a to skoro 55 %. Více než polovina nekuřáků i bývalých kuřáků si myslí, že elektronická cigareta je zdravější než normální. Kuřáků si to myslí pouze 40 %. Může to být ovlivněno i jejich vnitřním pocitem, že když už kouří klasickým způsobem, musí si to alespoň omluvit, že kouření elektronických cigaret zdravější nebude.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením nikotinu v různých druzích výrobků. Teoretická část je zaměřena na nikotin, jeho působení na organismus a zdravotní zhodnocení. Dále pojednává o kouření, závislosti na něm a možných způsobech odvykání pomocí náhradní nikotinové terapie.

V experimentální části byla nejdříve optimalizovaná metoda stanovení nikotinu pomocí HPLC. Hledaná metoda měla být rychlá a jednoduchá. K tomu byl využit standard nikotinu od firmy Sigma-Aldrich. Jako nejvhodnější stacionární fáze byla vyhodnocena kolona Kinetex 5u C18 100A 150 x 4,6 mm. Při optimalizaci mobilní fáze byly testovány vhodné organické a vodné fáze a jejich různé poměry. Nejlepších výsledků se dosáhlo s čistým methanolem, kdy získaný chromatogram vykazoval nejlepší rozlišení píku. Změny teploty analýzy neovlivňovalo, proto byla určena jako vhodná teplota při laboratorních podmínkách.

V další fázi experimentální části byla optimalizována extrakce nikotinu z různých druhů matrix. Jednalo se o tabákový materiál, konkrétně cigarety a šňupací tabák, dále nikotinové žvýkačky, nikotinové pastilky, orodispergovatelný nikotinový film, nikotinový sprej a náplně do elektronických cigaret.

Pro tabákový materiál byla za nejvhodnější zvolena extrakce v methanolu probíhající alespoň 24 hodin a následné podrobení ultrazvuku po dobu 10 sekund. Při nižších časech množství izolovaného nikotinu nebylo konstantní. Pro analýzu nikotinu v reálných vzorcích bylo použito 10 druhů běžně oblíbených značek cigaret. S klesající silou cigaret a množstvím nikotinu uvolňovaného do organismu (deklarováno výrobcem) klesalo i množství stanoveného nikotinu v celé cigaretě. U nejsilnějších cigaret bylo nejvyšší množství nikotinu naměřeno u výrobku Marlboro red, 13,9 mg. U nejslabšího výrobku, konkrétně Kiss superslims strawberry, bylo zjištěno 7,5 mg nikotinu. Šňupací tabáky byly pro analýzu vybrány dva. U výrobku Gletscher Prise Snuff byl zjištěn obsah nikotinu $6,6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, u výrobku Red Bull Strong Snuff pak $10,4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Náplně do elektronických cigaret bylo analýze podrobena celkem 18 druhů, a to dvě bezpříchuťové koncentrační řady různých výrobců a 7 náplní s příchutí od tří různých výrobců s koncentrací nikotinu $16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Při koncentracích 0 mg skutečně nebylo analyzováno žádné množství nikotinu. Ostatní hodnoty se celkem blížily deklarovaným množstvím, pouze u výrobku Desert ship 18 mg bylo opakovaně naměřeno pouze 11,2 mg nikotinu. Náplně bez příchutě byly pouze patřičně zředěny methanolem, u náplní s příchutí byly takto získané výsledky nevyhovující, tak bylo u náplně nejdříve upraveno pH pomocí hydroxidu sodného. Vzorky byly zředěny NaOH v poměru 1:1 a až poté zředěny patřičně methanolem. Nejpresnějšího výsledku s porovnáním s deklarovanou hodnotou bylo dosaženo u výrobku Crème caramel, což je jediný zastoupený výrobek od značky Equites v analyzované sadě vzorků. Naměřená hodnota byla $15,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Nejnižšího výsledku bylo zjištěno u výrobku Banana od firmy Joytech, a to $14,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Nikotinový sprej byl pouze zředěn methanolem a podroben deseti sekundám ultrazvuku. Obsah nikotinu v celém balení, což bylo 15 ml, byl stanoven na 10,05 mg nikotinu, což je menší množství než je deklarováno na obalu. Výrobce uváděl množství 11 - 13,5 mg.

Jako nejúčinnější způsob extrakce nikotinu ze žvýkaček, byla ověřena metoda extrakce s využitím 5% hydroxidu sodného po dobu alespoň 24 hodin. U žvýkaček Nicorette mentholové, kde byla udávaná hodnota 4 mg na žvýkačku, bylo stanoveno 3,98 mg nikotinu. Stejně tak pro Nicorette fresh fruit s 2 mg nikotinu byla změřená hodnota velice

blízká, a to 1,99 mg. U žvýkaček bylo dále vyzkoušeno změření zbývajícího množství nikotinu po vyžvýkání. Zjištěný zbytkový obsah nikotinu je poměrně vysoký, u 4 mg žvýkaček 68 % a u 2 mg žvýkaček 77 %. Rozdíly mohou být způsobeny i tím, že každou žvýkačku žvýkal jiný dobrovolník a tudíž žvýkali s jinou intenzitou.

Pro nikotinové pastilky byla za nejvhodnější postup pro analýzu nikotinu zvolena extrakce v 5% hydroxidu sodném. Tímto způsobem se podařilo změřit 2,49 mg nikotinu v jedné pastilce. Ovšem množství deklarováno výrobcem bylo 4 mg.

Nejvyšších změřených množství nikotinu u orodispergovatelného filmu bylo při extrakci 5% hydroxidem sodným. Množství 1,67 mg nikotinu v jednom filmu neodpovídalo zcela deklarovanému množství, které bylo 2,5 mg nikotinu.

V práci byl navržen i vlastní nikotinový produkt. Konkrétně byly navrženy malé gelové kapsle s enkapsulovaným nikotinem, které by se potenciálně spolklly, či rozžvýkaly. Částice s nikotinem byly připraveny pomocí manuální enkapsulace, kdy byl polysacharidový roztok přikapáván do srážecího roztoku pipetou. Za nejvhodnější materiál pro výrobu kapslí byl vybrán 2% alginát-škrobový roztok. Enkapsulační účinnost u něj byla stanovena na téměř 99 %. Jako modelové prostředí pro uchování částic bylo vybráno vodné prostředí. Za 3 týdny skladování se uvolnilo pouze 1,1 % enkapsulovaného nikotinu. Dále byla vyzkoušena stabilita v umělých trávicích šťávách pro simulaci uvolnění nikotinu v organismu. Po postupném natrávení žaludeční, pankreatickou a žlučovou šťávou bylo z částic uvolněno přes 20 % nikotinu. V reálné situaci by mohlo být uvolnění nikotinu ještě vyšší, zejména v ohledu na delší dobu trávení, či vstřebávání v ústech.

Posledním bodem experimentální části této práce, byl spotřebitelský dotazník. Byl navržen tak, aby se zaměřil na představu lidí o jiných zdrojích nikotinu, než jsou klasické cigarety, zda jsou lidé pro tyto alternativy a jestli jim pomáhají v odvykání kouření. Dále o informovanosti lidí o nikotinu jako látky takové či jen pro představu, kolik toho lidé vykouří. Bylo zjištěno, že tři čtvrtiny bývalých kuřáků a o trochu více kuřáků kouří lehké cigarety. Neinformovanost kuřáků o tom co vlastně kouří je zarážející, pouze 50 % lidí zná koncentrace nikotinu, které přijímají. 75 % kuřáků si myslí, že má nikotin i pozitivní účinky, bývalých kuřáků si to myslí pouze 45 %, nekuřáků skoro 55 %. Více než polovina nekuřáků i bývalých kuřáků si myslí, že elektronická cigareta je zdravější než normální, kuřáků si to myslí pouze 40 %. Pouze 13 procentům bývalých kuřáků pomohl přestat kouřit některý z produktů náhradní nikotinové terapie.

Pro stanovení nikotinu byla v předložené práci optimalizována metoda pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledná metoda je velmi jednoduchá a rychlá, avšak u některých druhů výrobků je nevýhoda v dlouhé přípravě vzorku.

V dnešní populaci je značné množství osob, které jsou závislé na kouření a nikotinu. Proto je třeba hledat co nejvíce možností, jak jim se závislostí pomoci. Jedním způsobem by mohla být větší informovanost o následcích a škodlivosti kouření. Jinou možností je navržení a výroba nových či méně obvyklých produktů obsahujících nikotin, které by kuřáky mohly zaujmout a být efektivní náhradou při odvykání kouření.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Tobacco. *World Health Organization* [online] 2015 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.who.int/topics/tobacco/en/>
- [2] World Health Organization: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision, Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2010. 195 s. ISBN 978 92 4 154834 2
- [3] GRANA, R., BENOWITZ, N., GLANTZ A., E-Cigarettes: A Scientific Review. *Circulation* [online]. 2014-05-12, vol. 129, issue 19, [cit. 2015-04-24]. Dostupné z: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667>
- [4] The Long Tobacco Road. *Randomhistory* [online]. 2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://www.randomhistory.com/2009/01/31_tobacco.html
- [5] TRIMARCHI, M, O'CONNELL, M., How Nicotine Works. *Howstuffworks.com* [online]. 2001 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/nicotine.htm>
- [6] SULLIVAN, M., *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker. [online] 2011 [cit. 2015-04-19] Dostupné z: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Phytophthora/Ppnicotianae.htm>
- [7] MCMURRY, J., *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, s. 892, 1176, 61, 31 s. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [8] (-)-Nicotine. *Sigma-Aldrich*. [online] 2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure4/116/mfcd00006369.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00006369-large.png
- [9] Cotinine. *National Biomonitoring Program* [online] 2013 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://www.cdc.gov/biomonitoring/Cotinine_BiomonitoringSummary.html
- [10] Patočka, J., Kotinin a kotininový test. *toxikology* [online] 2008 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: www.toxicology.cz
- [11] HYNIE, S., *Farmakologie v kostce*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2001, 520 s. ISBN 80-725-4181-1.
- [12] Nicotine dependence. *MAYO CLINIC*. [online] 2015 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/nicotine-dependence/basics/definition/con-20014452>

- [13] Nicotine. *Psychology Today*. [online] 2014 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <https://www.psychologytoday.com/conditions/nicotine>
- [14] PETR, J., Závislost na nikotinu neurčují jen geny. *Objective Source E-Learning*. [online] 2008 [cit. 2015-04-18]. Dostupné z: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=3780>
- [15] Nicotine. *The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*. [online] 2014 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/niosh/idlh/54115.HTML>
- [16] LARDI, C., S. VOGT, S. POLLAK a A. THIERAUF. Complex suicide with homemade nicotine patches. *Forensic Science International* [online]. 2014, vol. 236, e14-e18 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073813005409>
- [17] LEARY, W. E., Researchers Investigate Nicotine's Potential Benefits. *The New York Times* [online] 1997 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.nytimes.com/1997/01/14/science/researchers-investigate-horrors-nicotine-s-potential-benefits.html>
- [18] HEIDE F, DIJKSTRA A, ALBERSNAGEL F. A, KLEIBEUKER J. H. Active and passive smoking behaviour and cessation plans of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* [online]. 2010, vol. 4, 2 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873994609001019>
- [19] Česká republika. Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *zakonyprolidi.cz*. 1997. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110/info>
- [20] Česká republika. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky na tabákové výrobky. In: *zakonyprolidi.cz*. 2003. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-344>
- [21] Česká republika. Zákon o opatřeních k ochraně před škodami působenými tabákovými výrobky, alkoholem a jinými návykovými látkami a o změně souvisejících zákonů. In: *zakonyprolidi.cz*. 2005. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2005-379>
- [22] Patočka, J., Jedy tabákového kouře. *toxikology* [online] 2007 cit. 2015-04-20]. Dostupné z: www.toxicology.cz
- [23] WILLIAMS, M., Electronic cigarette liquids and vapors: is it harmless water vapor. [online] 2013 cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.trdrp.org/files/e-cigarettes/williams-slides.pdf>

- [24] The Effects of Secondhand Smoke. *webmd.com* [online] 2014 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.webmd.com/smoking-cessation/effects-of-secondhand-smoke>
- [25] GRYCZYŃSKA, D, J KOBOS a A ZAKRZEWSKA. Relationship between passive smoking, recurrent respiratory tract infections and otitis media in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* [online]. 1999, vol. 49, [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165587699001780>
- [26] Barone-Adesi, F., Vizzini, L., Richiardi, L., Short-term effects of Italian smoking regulation on rates of hospital admission for acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 2468–2472
- [27] ETTER, J. F., Edward, J. C., A. R. BUCHHALTER, J. E. HENNINGFIELD, J. M. ROHAY, J. G. GITCHELL, J. M. PINNEY a T. CHAU. Dependence on the nicotine gum in former smokers: Effect of polymer and plasticizer blends. *Addictive Behaviors* [online]. 2009, vol. 34, issue 3, [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306460308003006>
- [28] FAGERSTRÖM, K. O., K. BRIDGMAN. Tobacco harm reduction: The need for new products that can compete with cigarettes. *Addictive Behaviors* [online]. 2014, vol. 39, issue 3 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306460313003729>
- [29] PICHAYAKORN, W., J. SUKSAEREE, P. BOONME, T. AMNUAIKIT, W. TAWEEPRED a G. C. RITTHIDEJ. Nicotine transdermal patches using polymeric natural rubber as the matrix controlling system: Effect of polymer and plasticizer blends. *Journal of Membrane Science* [online]. 2012, 411-412, s. 81-90 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738812003171>
- [30] Nicotine Transdermal Patch. *MedlinePlus Trusted Health Information for You* [online] 2013 cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a601084.html#skip>
- [31] PARK, C. R., MUNDAY, D. L.. Development and evaluation of a biphasic buccal adhesive tablet for nicotine replacement therapy. *International Journal of Pharmaceutics* [online] 2002, vol. 237, issues 1-2, s. 215-226. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302000418>
- [32] Nicotine and related disorders. *Encyclopedia of Mental Disorders*. [online]. 2015 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.minddisorders.com/Kau-Nu/Nicotine-and-related-disorders.html>

- [33] SHIFFMAN, S., E. J. CONE, A. R. BUCHHALTER, J. E. HENNINGFIELD, J. M. ROHAY, J. G. GITCHELL, J. M. PINNEY a T. CHAU. Rapid absorption of nicotine from new nicotine gum formulations: Effect of polymer and plasticizer blends. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* [online]. 2009, vol. 91, issue 3, s. 380-384 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305708002852>
- [34] Příbalová informace výrobku NICORETTE FRESHFRUIT GUM 30X2 MG Žvýkačky. 2009
- [35] Nicotine Gum Side Effects: Stories From Long Term Users. *Quit smoking community*. [online]. 2014 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <https://quitsmokingcommunity.org/nicotine-gum-side-effects-stories/>
- [36] Příbalová informace výrobku NICORETTE MINT LISOVANÉ PASTILKY 20X4 MG. 2013
- [37] İKINCI, G, S ŞENEL, C. G. WILSON, M ŞUMNU, J. M. ROHAY, J. G. GITCHELL, J. M. PINNEY a T. CHAU. Development of a buccal bioadhesive nicotine tablet formulation for smoking cessation: Effect of polymer and plasticizer blends. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, vol. 277, 1-2, s. 173-178 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517304001449>
- [38] Příbalová informace výrobku NIQUITIN MINT ORODISPERGOVATELNÝ FILM ORM FLM 15X2.5 MG Disperze. 2011
- [39] Příbalová informace výrobku NICORETTE SPRAY 1 MG/DÁVKA 1X13.2 ML/150 MG Ústní sprej. 2012.
- [40] Nicotine Replacement Therapy. *Dr Colin Mendelsohn Skomers Clinic* [online] 2015 cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://colinmendelsohn.com.au/>
- [41] How Do I Choose an E-liquid Strength? *VaperTrain* [online] 2013 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.vapertrain.com/page/hdics>
- [42] SHIFFMAN, S., E. J. CONE, A. R. BUCHHALTER, J. E. HENNINGFIELD, J. M. ROHAY, J. G. GITCHELL, J. M. PINNEY a T. CHAU. Rapid absorption of nicotine from new nicotine gum formulations: Effect of polymer and plasticizer blends. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* [online]. 2009, vol. 91, issue 3, s. 380-384 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305708002852>
- [43] CASSIDY, S. How Electronic Cigarettes Work. *Howstuffworks.com* [online]. 2011 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/innovation/everyday-innovations/electronic-cigarette.htm>

- [44] What is electronic cigarette? *E-CigaretteLobby* [online]. 2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <https://www.ecigarettelobby.com/what-is-e-cigarette.html/>
- [45] What is an E-Cigarette? *Ecigarette Reviewed* [online] 2015 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://ecigarettereviewed.com/about-e-cigs>
- [46] Pozitivní poměr přínosů a rizik pro vareniklin byl potvrzen. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online] 2011 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/pozitivni-pomer-prinosu-a-rizik-pro-vareniklin-champix>
- [47] COE, J. W., BROOKS, P.R., VETELINO, M.G., et al. Varenicline: an $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J Med Chem* 2005; 48: 3474–3477
- [48] FOULDS J. The neurobiological basis for partial agonist treatment of nicotine dependence: varenicline. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 571–576.
- [49] High Performance Liquid Chromatography. *Waters* [online] 2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=10048919
- [50] ČÁSLAVSKÝ, J., *Kurz analytická chemie II BCO_ACHII* [online] [cit. 2013-11-30]. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/elearning/course/view.php?id=137553>
- [51] DOUŠA, M. Typy detektorů v HPLC. *hplc.cz* [online] 2013 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: www.hplc.cz
- [52] YASUDA, M., T. OTA, A. MORIKAWA, K. MAWATARI, T. FUKUUCHI, N. YAMAOKA, K. KANEKO a K. NAKAGOMI. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in serum using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection and postcolumn UV-photoirradiation system. *Journal of Chromatography B* [online]. 2013, vol. 934, 1-2, s. 41-45 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023213003498#bib0050>
- [53] CHANG, Y., P. TSAI, Y. CHOU, J. TIEN a T. TSAI. Simultaneous determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in rat blood and brain tissue using microdialysis coupled with liquid chromatography: Pharmacokinetic application. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, vol. 1088, 1-2, s. 152-157 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305001123>
- [54] TAMBWEKAR, K. R., R. B. KAKARIYA, S. GARG, J. TIEN a T. TSAI. A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations: Pharmacokinetic application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2003, vol. 32, issue 3, s. 441-450 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170850300236X>

- [55] TSINISIZELI, N., G. SOTIROUDIS, A. XENAKIS a K. E. LYKERIDOU. Determination of nicotine and cotinine in meconium from Greek neonates and correlation with birth weight and gestational age at birth. *Chemosphere* [online]. 2015, vol. 119, s. 1200-1207 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653514011801>
- [56] HOSSAIN, A. M. a S. M. SALEHUDDIN. Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography–mass spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2013, vol. 6, issue 3, s. 275-278 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187853521000211X>
- [57] FANG, Z., B. BHANDARI. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science* [online]. 2010, vol. 21, issue 10, s. 510-523 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410001925>
- [58] NEDOVIC, V., A. KALUSEVIC, V. MANOJLOVIC, S. LEVIC a B. BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s. 1806-1815 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11002665>
- [59] BÜCHI LABORTECHNIK AG. Návod k použití: enkapsulátor B-395 Pro. 2011
- [60] VLASE, L, FILIP, L., MÎNDRUȚĂU, I., LEUCUTA, S. E. Determination of nicotine from Tobago by LC-MS-MS [online] 2005 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.itim-cj.ro/srms/C5-LaurianVlase.pdf>
- [61] Československý lékopis. Praha: Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, 1987

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CNS Centrální nervový systém
PAU Polycyklické aromatické uhlovodíky
HPLC High performance liquid chromatography
PDA Photodiode Array

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Fagerströmův test nikotinové závislosti

Příloha č. 2: Dotazník pro kuřáky

Příloha č. 3: Dotazník pro bývalé kuřáky

Příloha č. 4: Dotazník pro nekuřáky

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha č. 1: Fagerströmov test nikotinové závislosti a jeho vyhodnocení

- 1) Jak brzy po probuzení vykouříte první cigaretu?
 - a) po více než hodině (0 bodů)
 - b) za 31 - 60 minut (1 bod)
 - c) za 6 - 30 minut (2 body)
 - d) do 5 minut (3 body)
- 2) Je pro vás těžké nekouřit tam, kde je to zakázáno?
 - a) ne (0 bodů)
 - b) ano (1 bod)
- 3) Které cigarety jste nejméně ochotni se vzdát?
 - a) první ranní (1 bod)
 - b) kterékoliv jiné (0 bodů)
- 4) Kolik cigaret denně kouříte?
 - a) méně než 10 (0 bodů)
 - b) 11 - 20 (1 bod)
 - c) 21 - 30 (2 body)
 - d) více než 30 (3 body)
- 5) Kouříte během první hodiny po probuzení častěji než během zbytku dne?
 - a) ne (0 bodů)
 - b) ano (1 bod)
- 6) Kouříte, i když jste nemocní tak, že trávíte většinu dne v posteli?
 - a) ne (0 bodů)
 - b) ano (1 bod)

Do 5 bodů je závislost zhodnocená jako slabá, 5 - 7 bodů napovídá o silné nikotinové závislosti a celkový počet bodů vyšší než 7 je už hodnocena jako extrémní závislost.

10.2 Příloha č. 2: Dotazník pro kuřáky

Otázky a výběr odpovědí zaměřené na kuřáky byly následující. Otázky č. 6 a 9 byly zvoleny jako volná odpověď na doplnění konkrétního údaje.

1. Věk
 - méně než 18
 - 18 - 30
 - 31 a více
2. Pohlaví
 - žena
 - muž
3. Jaké cigarety kouříte?
 - slabé
 - silné

4. Kolik cigaret vykouříte za den?
 - 1 - 5
 - 6 - 10
 - 11 - 20
 - více než 20
5. Vyzkoušeli jste někdy příjem nikotinu jinak než v klasické cigaretě?
 - Ano
 - Ne
6. Na jaké jiné zdroje nikotinu než v klasické cigaretě si vzpomenete?
7. Znáte koncentraci nikotinu ve výrobcích, které užíváte?
 - Ano
 - Ne
8. Myslíte si, že jsou elektronické cigarety zdravější než klasické?
 - Ano
 - Ne
9. Znáte smrtelnou dávku nikotinu? Jaká to je?
10. Myslíte si, že má nikotin i nějaké pozitivní účinky?
 - Ano
 - Ne

10.3 Příloha č. 3: Dotazník pro bývalé kuřáky

Otázky a výběr odpovědí zaměřené na bývalé kuřáky byly následující. Otázky č. 6, 10 a 11 byly zvoleny jako volná odpověď na doplnění konkrétního údaje.

1. Věk
 - méně než 18
 - 18 - 30
 - 31 a více
2. Pohlaví
 - žena
 - muž
3. Jaké cigarety jste kouřili?
 - slabé
 - silné

4. Kolik cigaret za den jste vykouřili?
 - 1 - 5
 - 6 - 10
 - 11 - 20
 - více než 20
5. Vyzkoušeli jste někdy příjem nikotinu jinak než v klasické cigaretě?
 - Ano
 - Ne
6. Na jaké jiné zdroje nikotinu než v klasické cigaretě si vzpomenete?
7. Pomohly vám některé tyto výrobky přestat kouřit?
 - Ano
 - Ne
8. Proč jste přestali kouřit?
 - ze zdravotních důvodů
 - přestalo mě to bavit
 - bylo to už příliš drahé
 - jiný důvod...
9. Myslíte si, že jsou elektronické cigarety zdravější než klasické?
 - Ano
 - Ne
10. Ocenili byste i jinou alternativu příjmu nikotinu na trhu? Jakou byste navrhli?
11. Znáte smrtelnou dávku nikotinu? Jaká to je?
12. Myslíte si, že má nikotin i nějaké pozitivní účinky?
 - Ano
 - Ne

10.4 Příloha č. 4: Dotazník pro nekuřáky

Otázky a výběr odpovědí zaměřené na nekuřáky byly následující. Otázky č. 4 a 6 byly zvoleny jako volná odpověď na doplnění konkrétního údaje.

1. Věk
 - méně než 18
 - 18 - 30
 - 31 a více

2. Pohlaví
 - žena
 - muž
3. Proč nekouříte?
 - smrdí mi to
 - nebudu si ničit zdraví
 - je to příliš drahé
 - jiný důvod...
4. Na jaké jiné zdroje nikotinu než v klasické cigaretě si vzpomenete?
5. Myslíte si, že jsou elektronické cigarety zdravější než klasické?
 - Ano
 - Ne
6. Znáte smrtelnou dávku nikotinu? Jaká to je?
7. Myslíte si, že má nikotin i nějaké pozitivní účinky?
 - Ano
 - Ne